

N° d'ordre 36

Série A

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marguerite COZIC

LICENCIÉE-ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE BACTERIUM XYLINUM.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 octobre 1933, devant la Commission d'examen

Président.... MM. DUPONT *Professeur*

Examineurs (DAURE *Professeur*
(GENEVOIS *Professeur*

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4, RUE DANTE, 4

1933

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marguerite COZIC

LICENCIÉE-ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE BACTERIUM XYLINUM.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *21 octobre* 1933, devant la Commission d'examen

Président... MM. DUPONT *Professeur*

Examinateurs (DAURE *Professeur*

(GENEVOIS *Professeur*

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4, RUE DANTE, 4

1933

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen	DUPONT	Chimie Industrielle
Doyens honoraires	{ PADÉ	Recteur de l'Académie de Dijon
	{ PICART	Astronomie
Professeurs honoraires	{ BÉNARD	
	{ VÈZES	
	{ VIGOUROUX	
	{ SAUVAGEAU	
	{ DEVAUX	
	{ BOUNHIOL	
	{ RICHARD	
Professeurs	{ MILLOUX	Calcul infinitésimal.
	{ PICART	Astronomie
	{ GUINCHANT	Physique Générale
	{ TRUCHET	Chimie Organique
	{ DUPONT	Chimie Industrielle
	{ CHAÎNE	Anatomie Comparée et Embryogénie
	{ TROUSSET	Mécanique Rationnelle
	{ MERCIER	Physique Expérimentale
	{ DAGUIN	Géologie et Minéralogie
	{ DAURE	Physique
	{ KIRRMANN	Chimie Minérale et Chimie Physique
	{ FEYTAUD	Zoologie
	{ DANGEARD	Botanique.
	{ GENEVOIS	Chimie Biologique et Physiologie Végétale
Maitre de Conférences honoraire :	MANVILLE.	
Maîtres de Conférences	{ N.	Chimie
	{ AVEL	Zoologie
	{ GARD	Botanique
Maitre de Confér. adj.	ARRIVAUT	
Secrétaire	ARTIGUELONG	



A Monsieur M. Molliard

*Membre de l'Institut,
Doyen honoraire de la Faculté des Sciences de l'Université de Paris,
Professeur de Physiologie végétale.*

A mon maître Monsieur L. Genevois

*Professeur de Chimie biologique et Physiologie végétale
à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux*

En témoignage de profonde reconnaissance



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548415_0004

A mes chers Parents

*A tous ceux qui m'ont aidée
dans l'accomplissement de ce travail*

INTRODUCTION

L'étude biochimique d'une bactérie peut être envisagée de trois points de vue différents :

1^o. — On envisage d'une façon statique, les réactions chimiques déterminées par la Bactérie. Ainsi G. BERTRAND a montré que *B. xylinum* oxyde la glycérine en dioxycétone. TARR et HIBBERT, Mme Y. KHOUVINE ont dressé avec cette même bactérie des bilans complets, tenant compte de l'oxygène absorbé, du CO² dégagé, des polyalcools transformés, enfin de la cellulose formée. Cette biochimie statique a pris naissance avec les travaux de Pasteur ; elle est le meilleur fondement de la classification des bactéries.

Jusqu'ici, *B. Xylinum* avait été étudiée en présence d'oxygène ; l'oxygène n'est qu'un cas particulier des corps oxydants ; il est possible de le remplacer par des colorants accepteurs d'hydrogène, qui ont l'avantage de donner des équilibres réversibles. Les travaux de l'école biochimique moderne, de W. M. CLARK, ont fait connaître la théorie des potentiels d'oxydoréduction, et des oxydations sans intervention d'oxygène libre. *B. xylinum* réduit parfaitement en anaérobiose, toute une gamme de colorants, tandis qu'il apparaît dans la solution des corps réducteurs. L'activité oxydante des bactéries cétogènes apparaît donc indépendante de la présence d'oxygène. Il m'a été ainsi possible de généraliser à *B. xylinum* des résultats acquis par WIELAND, BERTHO et leur école pour les bactéries acétiques proprement dites, et de donner une interprétation thermodynamique de l'ensemble des résultats.

2^o. — On envisage d'une façon dynamique les mêmes réactions chimiques : la bactérie prend figure d'un catalyseur ayant non plus une action qualitative, mais une action quantitative définie dans le temps. Au lieu d'envisager des temps de plusieurs semaines, on envisage des temps de quelques quarts d'heure. Les phénomènes deviennent beaucoup plus nets. Cette cinétique chimique de la bactérie permet l'étude facile des inhibiteurs. Le mécanisme de la réaction chimique devient le problème principal. Pareille étude n'avait jamais été abordée pour *B. xylinum*.

Ces quelques pages ont essayé une esquisse de cette cinétique chimique.

Cette cinétique est facile à étudier, par la méthode manométrique, dans le cas où la réaction se fait aux dépens de l'oxygène libre. Elle peut se suivre tout aussi facilement lorsque la réaction consiste en une réduction de colorants, par la méthode des tubes de Thunberg. C'est ainsi que j'ai pu comparer quantitativement le métabolisme aérobie et anaérobie de *B. xylinum*.

3°. — On peut enfin envisager les relations entre la croissance de la bactérie et les réactions productrices d'énergie. Il se trouve, en ce qui concerne les réactions aérobies, que cette étude ne conduit à aucun résultat nouveau : les corps oxydés sont identiques aux corps permettant la croissance de la bactérie. Tout au contraire, les réactions anaérobies conduisent à un résultat surprenant : non seulement la bactérie peut oxyder son substrat aux dépens d'accepteurs d'hydrogène divers, mais encore elle peut croître, lentement, mais d'une façon absolument nette, aux dépens de ces réactions d'oxydoréduction. Ce fait est entièrement nouveau : aucune bactérie acétique, aucune cellule franchement aérobie, dépourvue de toute fermentation des glucides, n'a encore été cultivée en anaérobiose. Cette cellule bactérienne paraît donc remarquablement souple : elle peut croître et produire sa zoogée de cellulose en anaérobiose, aux dépens de l'alcool éthylique et de la glycérine.

Monsieur le Professeur M. Molliard, introducteur en France des oxydoréductions dans la botanique a bien voulu me faire le grand honneur de publier ce travail dans la *Revue générale de Botanique*, qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma respectueuse gratitude.

Je prie M. le Professeur L. GENEVOIS de vouloir bien trouver ici l'expression de mes sentiments profondément reconnaissants pour la bonté avec laquelle il m'a accueillie dans son laboratoire. M. le Professeur L. GENEVOIS, pionnier de la biochimie moderne, m'a confié cette étude et m'a initiée aux diverses techniques ne ménageant ni son temps, ni sa peine. Je le prie de vouloir bien agréer, avec l'expression de tous mes plus vifs remerciements pour l'aide constante qu'il m'a apportée, l'hommage de mes sentiments respectueux et dévoués.

CHAPITRE PREMIER

BACTERIUM XYLINUM

- § 1. — Caractères généraux.
- § 2. — Morphologie. Obtention d'une souche.
- § 3. — Nature de la membrane.
- § 4. — Milieux propres au développement.
- § 5. — Facteurs agissant sur la croissance.
- § 6. — Place dans la classification.

§ 1. — Caractères généraux.

Bacterium xylinum est une bactérie acétique, cétogène découverte par BROWN en 1886. Dans son mémoire « Un ferment acétique qui produit de la cellulose » il étudie tous les principaux caractères de cette nouvelle bactérie isolée de la mère du vinaigre. Elle diffère essentiellement des bactéries acétiques connues par la propriété qu'elle a de former, sur les milieux qui lui sont favorables, une membrane épaisse qui a les propriétés et la composition de la cellulose, en particulier sa solubilité dans la liqueur cupro-ammoniacale, d'où son nom de *Bacterium xylinum*.

En 1896 Gabriel BERTRAND, étudiant le sucre de Pelouze (1882) ou sorbose, s'aperçoit que celui-ci ne préexiste pas dans le jus de sorbes, mais qu'il provient de la transformation du sorbitol en sorbose sous l'influence d'un microbe, véhiculé par la mouche des vinaigrieres, *Drosophila cellaris*.

« Je le crois, dit-il, sinon identique au *Bacterium xylinum* de BROWN, du moins très rapproché de celui-ci. » et, dans une série de mémoires de 1896 à 1904, puis dans sa thèse en 1904, Gabriel BERTRAND étudie longuement les propriétés chimiques du microbe

qu'il appelle bactérie du sorbose et dont EMMERLING montre en 1899 l'identité avec *Bacterium xylinum*.

Cette bactérie a été étudiée par de nombreux auteurs.

Les caractères morphologiques ont été déterminés par BROWN, (1886), G. BERTRAND (1896), HENNEBERG (1926).

Différentes manières de se procurer la bactérie ont été appliquées, par BROWN, G. BERTRAND, S. HERMANN (1928).

De nombreux travaux sont relatifs à la membrane de *B. xylinum* dont la nature a été fort discutée. BROWN, (1886) BROWNE, (1906) sont pour sa nature cellulosique, EMMERLING (1889), G. BERTRAND (1904), contre, mais la question a été définitivement réglée par l'affirmative grâce aux travaux de EGGERT, LUFT (1930), HIBBERT et BARSHA (1931) Y. KHOUVINE, CHAMPETIER et SUTRA (1931).

Les milieux de culture employés sont très divers, tant naturels pour conserver la souche, qu'artificiels pour cultiver la bactérie. BROWN ayant découvert *B. xylinum* dans la mère du vinaigre, emploie tout naturellement le vin et, G. BERTRAND l'ayant trouvé dans le jus de sorbe préconise les jus de fruits, quant à S. HERMANN, il préfère le thé puisqu'il a trouvé *B. xylinum* dans le Kombucha utilisé dans l'Europe Centrale et Orientale pour préparer une boisson fermentée à partir du thé sucré, boisson appelée en Russie Theekvas.

Les différents travailleurs portent leur choix sur le procédé qui leur est le plus facile, et tous emploient, comme milieu d'étude, la décoction de levure ou le milieu synthétique de TARR et HIBBERT que nous verrons plus loin, additionnés d'un aliment.

Différents facteurs agissent sur la croissance : la température, la concentration, le pH, l'épaisseur de la couche. Certaines qualités sont indispensables aux souches utilisées pour l'ensemencement ; mais, grâce à ses propriétés tout à fait particulières, *B. xylinum* occupe une place bien déterminée dans la classification des bactéries acétiques.

§ 2. — Morphologie. — Obtention d'une souche.

Bacterium xylinum se présente sous forme de bâtonnets, de 2 à 3 μ de longueur, sur 0 μ , 5 environ d'épaisseur, enveloppés dans une substance formée de cellulose.

Les bâtonnets sont facilement colorés par les couleurs d'aniline contrairement à la substance qui les englobe.

Dans les cultures anciennes, on voit, à la place des bâtonnets, des granulations sphériques ayant à peu près $0\ \mu, 5$ de diamètre qui sont peut-être des spores. BROWN a trouvé dans les milieux défavorables de longs fils ressemblant à des *Leptothrix*.

La culture commence par un ou plusieurs flocons très transparents qui reposent au fond des matras et croissent lentement jusqu'à la surface du liquide, dès ce moment toute la masse microbienne vient s'étaler à l'air en plein contact avec l'oxygène.

Il est bon de favoriser la montée de la zooglée dans les milieux profonds par agitation giratoire ascensionnelle du liquide. La présence d'un dépôt au fond des matras est propice à la croissance de la zooglée à laquelle il sert de support. La membrane qui se forme s'épaissit progressivement et peut atteindre plusieurs centimètres d'épaisseur. Si un choc la détache de la surface, elle peut, soit venir mourir au fond du matras, soit s'enfoncer légèrement, et former une autre membrane. Par ce moyen nous avons obtenu une épaisseur de 10 cm. de zooglées superposées et il ne semble pas y avoir d'autre limite que la hauteur de la couche de liquide. En milieu solide les cultures forment à la surface ou à une très faible distance de celle-ci, des colonies rondes et opaques qui produisent sur la périphérie une très légère liquéfaction de la gélose. Leur dimension est de 1 à 1 mm 5 (MARKOFF et ZLATAROFF, 1926).

Tous les auteurs ont cultivé *B. xylinum* en aérobiose ; Hugo HAEHN et Margot ENGEL n'ont pu obtenir de croissance en anaérobiose. Nous verrons plus loin, au chapitre V, qu'il est parfaitement possible, en présence de colorants de potentiel d'oxydo-réduction convenable (rH^2 supérieur à 8) de faire croître la bactérie en anaérobiose parfaite, en tubes vides d'air et scellés. Il se forme en 10 jours, de petites zooglées bien caractérisées, de 1 cm² environ, aux dépens de la réduction de la matière colorante. Cette expérience, sur une bactérie aérobie, est tout à fait nouvelle.

On peut employer plusieurs méthodes pour obtenir une souche *B. xylinum*. Différents auteurs l'ont extraite de jus de fruits : en 1928 Siegwart HERMANN l'a isolée du Kombucha, G. BERTRAND se la procure par l'intermédiaire de la *Drosophila cellaris* qui la

véhicule habituellement. Tous nos essais pour nous la procurer par ce moyen furent vains.

Nous avons placé dans le laboratoire (Paris) des conserves de 250 cc³ remplies aux 3/4 de différents appâts : jus de cerises, jus de sorbes, mélange de vin, vinaigre et eau en proportions égales. Les mouches vinrent s'y noyer et apportèrent quantité de levures de toutes espèces, mais pas de bactérie de sorbose, et les essais furent nuls en été comme en hiver ; sans doute les mouches recueillies n'avaient pas rencontré la bactérie cherchée.

Nous fumes plus heureux en suivant la méthode de BROWN : en partant d'une mère du vinaigre qui nous fût fort aimablement donnée par M. LEMOIGNE, de l'Institut Agronomique, et qui contenait la bactérie. D'autre part, M. SCHOEN, de l'Institut Pasteur, mit obligeamment à notre disposition une souche pure.

La bactérie provenant de la mère du vinaigre est purifiée par un repiquage sur gélose inclinée, il suffit de procéder de la manière suivante : on prend avec le fil de platine, flambé et refroidi, la partie gélatineuse et translucide ; on la porte dans un matras ou une conserve contenant un mélange de parties égales de vin et d'eau plus 10 % de vinaigre ; en quelques jours, on a une jolie membrane, et, à partir de celle-ci onensemence par stries, avec la même prise sur trois tubes successivement. Les colonies sont ainsi de plus en plus espacées et l'on obtient une souche pure en deux ou trois repiquages.

§ 3. — Nature de la membrane.

La nature de la membrane a été très discutée. BROWN, en s'appuyant sur la solubilité de celle-ci dans la liqueur de Schweitzer, affirme sa nature cellulosique (1886). En effet, c'est là selon FRÉMY et URBAIN (1881) une réaction caractéristique de la cellulose. EMMERLING, dans son étude comparée sur *Bacterium xylinum* et la Bactérie du sorbose de Gabriel BERTRAND (1899) prépare des membranes qui ne sont que très légèrement solubles dans la liqueur cupro-alkaline, elles contiennent de 2 à 3 % d'azote, de plus, traitées par l'acide chlorhydrique, elles fournissent un produit cristallin qui ressemble au chlorhydrate de glucosamine et EMMERLING en conclut que la mem-

brane n'est pas constituée par de la cellulose pure mais qu'elle renferme aussi de la chitine ou une substance analogue.

Gabriel BERTRAND se range à cette opinion et dit même : « l'appellation de *Bacterium xylinum* ne serait pas tout à fait exacte puisque le microbe s'enveloppe non pas de cellulose mais de véritable chitine. » (1904)

La question est provisoirement abandonnée, mais BROWNE (1906) étudiant la membrane formée par un organisme qu'il croit identique à *Bacterium xylinum* ne peut confirmer les résultats d'EMMERLING : 1 % seulement de la membrane est insoluble dans la liqueur cupro-ammoniacale et surtout, elle ne contient pas 2 mais 0,2 % d'azote. Donc, si la chitine est présente, c'est seulement à l'état de traces. VAN WISSELINGH emploie de même la réaction cupro-ammoniacale pour rechercher la cellulose dans les cultures de dix-sept bactéries. *Bacterium xylinum* lui donne un résultat positif.

Enfin en 1930 EGGERT et LUFT étudient aux rayons X des membranes séchées et trouvent qu'elles donnent des diagrammes identiques à ceux qu'on obtient avec la cellulose. IPATJEF obtient les mêmes résultats.

En 1931 H. HIBBERT et J. BARSHA montrent que la membrane de *Bacterium xylinum* présente certains caractères chimiques de la cellulose, elle peut s'acétyle et après désacétylation donne un diagramme de diffraction aux rayons X semblable à celui de la cellulose des végétaux. Mme Y. KHOUVINE, G. CHAMPETIER et R. SUTRA (1931) obtiennent des résultats comparables à ceux de H. HIBBERT et J. BARSHA. Ils utilisent des polyalcools contenant un nombre très différent d'atomes de carbone : glycérol (3), sorbitol (6), α -glucoheptitol (7) et montrent que les membranes isolées des bouillons de culture sont de véritables membranes de cellulose.

« Simplement lavées à l'eau et pressées elles donnent un diagramme de diffraction des rayons X identique à celui fourni par les linters de coton. Séchées sous tension elles donnent des phénomènes d'orientation comparables à ceux obtenus par du coton en fibre. Après purification par épuisement au chloroforme, blanchiment à la soude à 2 % et à l'hypochlorite de sodium à 0,5 % les membranes présentent la résistance du parchemin. »

Mme Y. KHOUVINE, G. CHAMPETIER et R. SUTRA réalisent même la formation de dérivés nitrés et le phénomène de mercerisation.

La seule différence avec la cellulose du coton est « la plus grande difficulté à obtenir les dérivés correspondants » Selon les auteurs, la dissolution dans la liqueur de Schweitzer est difficile à réaliser, mais le produit reprecipité de cette solution donne bien, comme dans le cas du coton, le diagramme de la cellulose mercerisée.

SCHMIDT, ADERER et SCHEGG (1931) étudient également les propriétés des celluloses synthétiques obtenues par l'action de bactéries en employant l'analyse aux rayons X, l'hydrolyse et l'acétolyse.

R. SUTRA poursuivant son étude montre (1932) que l'azote des membranes n'est pas dû à la chitine mais aux protéines des corps bactériens contenus dans la membrane : le taux d'azote est trop faible (1,8 au lieu de 6,9 pour la chitine pure) et de plus, après une suite de traitements à la soude, à l'hypochlorite de sodium, à l'eau, à l'alcool, à l'éther qui laisseraient la chitine inattaquée, il n'y a pratiquement plus d'azote dans les membranes. « La chitine ne fait pas partie, même en faible proportion, de la membrane d'*Acetobacter xylinum* », et SUTRA croit cette dernière très proche de la tunicine ; Ces derniers travaux effectués avec beaucoup de soin ne nous permettent pas de douter de la nature cellulosique de la membrane de *Bacterium xylinum*.

Quant au critérium considéré longtemps comme primordial, du degré de solubilité de la membrane de *Bacterium xylinum* dans la liqueur de Schweitzer, il n'a qu'une valeur relative. Il ne dépend pas de l'atomicité des aliments employés. (Mme Y. KHOUVINE, G. CHAMPETIER et R. SUTRA obtiennent des celluloses identiques avec des polyalcools à 3,6 et 7 atomes de carbone) mais peut-être de la nature de ceux-ci : les celluloses des polyalcools sont-ils peu solubles, les celluloses des oses et des alcools plus solubles ? (BROWN, BROWNE).

§. 4. — Milieux propres au développement.

I. Milieux liquides.

a) Milieux naturels.

BROWN utilisait comme milieu de culture une dilution au demi de vin rouge additionnée de 1 % d'acide acétique sous forme de vinaigre ordinaire.

Les jus d'un grand nombre de fruits sont propres au développement de *Bacterium xylinum*, principalement ceux qui renferment du sorbitol ou du mannitol, donc particulièrement les sorbes, les cerises, les pommes, les abricots, les prunes, les poires (donc pomacées et amygdalacées) (G. BERTRAND.) Nous avons utilisé les jus des deux premières espèces de fruits. MARKOFF et ZLATAROFF (1926) l'ont cultivé sur jus de raisin.

Le jus de sorbes est préparé à partir de sorbes fraîches, égrénées, écrasées et débarrassées des sucres fermentescibles et de la pectine. Nous avons traité les sorbes par la levure pressée de boulanger, dans la proportion de 100 grammes de levure pour 5 kg de fruits et abandonné deux ou trois semaines à l'étuve à 28°. Après filtration sur tamis et sur papier, nous avons conservé le jus de sorbes dans des flacons bien remplis pour éviter l'oxydation par l'air et additionnés de 50 mg. d'acide monobromacétique par litre. (L. GENEVOIS)

Le jus de cerises peut être préparé de la même manière, mais celui que nous avons utilisé nous a été obligeamment fourni par la maison Hédiard de Paris. (jus de cerises naturel, non sucré)

Ces milieux doivent être stérilisés avant l'emploi, soit par filtration sur bougie Chamberland, soit, ce qui est plus facile, par chauffage à 105°, pendant 10 minutes, cela suffit à cause de l'acidité. Gabriel BERTRAND (1904) donne même des précautions spéciales pour le jus de sorbes, qui, chauffé devient facilement antiseptique pour la bactérie. « Cette transformation du jus paraît tenir à la présence d'une substance, primitivement sans action, qui se doublerait par le chauffage en présence de l'eau et de l'acide malique. » Il suffit donc de porter le jus pendant deux ou trois minutes à l'ébullition, jusqu'à ce que la vapeur passe à travers le tampon « On agite le liquide bouillant avec précaution de manière à le répartir sur la paroi du matras et à provoquer grâce à la surchauffe, un vif départ de vapeur et enfin on porte à l'étuve à 25-30° »

Le jus employé ne doit pas contenir plus de 10 % de matières dissoutes : un jus trop riche ne permet pas la croissance de la bactérie. Il suffit, en général, de diluer le jus naturel de son volume d'eau pour obtenir un milieu parfaitement adéquat au développement de la bactérie.

b) Milieux artificiels.

Les milieux naturels que nous venons de passer en revue sont complexes et difficilement utilisables pour l'étude des transformations chimiques, aussi BROWN dès 1886 utilise une solution d'eau de levure contenant 3 % d'une substance sucrée, ou la solution minérale de PASTEUR :

- 1.000 cc d'eau distillée.
- 0.1 gr. de tartrate d'ammonium ou 1 gr. de carbonate d'ammonium.
- 1,0 gr. de cendres de levure.
- 3 gr. de substance sucrée (glucose par exemple).

Gabriel BERTRAND au début de ses recherches (1896) emploie la solution suivante :

Peptone	10 gr.
Phosphate monopotassique	0, 100
Phosphate de sodium cristallisé.....	0, 100
Chlorure de sodium fondu.....	0, 660
Sulfate de magnésium cristallisé.....	0, 060
Substance étudiée.	50 gr.

le tout dissous dans un litre d'eau ordinaire. Mais il remarque bientôt que toutes les peptones commerciales ne conviennent pas à la bactérie, il revient à la technique de BROWN et remplace peptones et sels par une décoction de levure à 5 ‰ d'extrait sec.

Les peptones ou l'eau de levure seules produisent un faible développement de *Bacterium xylinum*, et TARR et H. HIBBERT qui étudient en 1931 la formation de membrane par cette Bactérie sur différents milieux, utilisent la solution suivante qui ne donne aucun développement en l'absence d'hydrates de carbone ou de composés hydrocarbonés.

Alcool éthylique.	5 ‰
Asparagine ..	1 ‰
KH ² PO ⁴	5 ‰
NaCl.....	1 ‰

L'asparagine est ici la source d'azote, l'alcool éthylique favorise la formation de la membrane.

Nous avons obtenu de très belles zooglées dans un milieu encore plus simple :

Eau ordinaire.	
Glucose.....	4 ‰

Dans tous nos travaux nous avons utilisé pour nos cultures soit le jus de cerises dilué au demi, soit l'autolysat de levure Sprin-

ger à 5 ‰ d'extrait sec additionné du corps étudié dans la proportion de 4 %

L'autolysat est préparé en abandonnant à l'étuve à 28°, dans un flacon fermé d'une couche de un ou deux centimètres de toluène, de la levure pure de boulangerie (marque Springer) diluée dans quatre à cinq fois son poids d'eau. Après vingt-quatre heures on enlève le toluène et on chauffe à 85-90° pendant deux heures. La solution filtrée contient environ 40 ‰ d'extrait sec, mais il est bon de la doser chaque fois.

Bacterium xylinum se développe rapidement sur couches minces, nous en verrons plus loin la raison, et c'est de cette manière qu'on l'étudie, mais, dans ces conditions, elle vieillit vite. Pour la conserver, il faut ensemercer sur couches profondes. L'on répartit donc les milieux étudiés ci-dessus dans des tubes à essai à raison d'une hauteur de 5 à 10 cm par tube.

Il est préférable de repiquer les souches sur jus de fruits, la bactérie conservant ainsi ses propriétés oxydantes, qu'elle perd partiellement quand elle est toujours ensemercée sur milieu synthétique. Pour la revivifier, il faut alors l'habituer peu à peu aux jus de fruits.

On peut y arriver en la repiquant successivement deux fois, dans chacun des mélanges suivants :

4 parties de milieu synthétique pour				1 partie de jus de fruits			
3	—	—	—	2	—	—	—
2	—	—	—	3	—	—	—
1	—	—	—	4	—	—	—
0	—	—	—	5	—	—	—

Avant de passer à l'étude des milieux solides utilisés pour le repiquage et la purification de *Bacterium xylinum*, nous tenons à rappeler un milieu liquide tout à fait particulier : c'est une décoction de thé sucré sur laquelle on ensemece *Bacterium xylinum*, on obtient en quelques jours une boisson très agréable, fort répandue en Tchéco-Slovaquie, en Bulgarie et sous le nom de Theekvas en Russie. Elle a été soigneusement étudiée par MARKOFF et ZLATAROFF (1926).

II. Milieux solides.

On utilise les milieux gélosés que l'on prépare de la façon suivante, qui est une adaptation de la technique générale. On pèse 30 grammes de gélose sèche et on la fait macérer dans l'eau distillée.

Après une demi-heure, la gélose est suffisamment gonflée, si nous la laissons plus longtemps dans l'eau, elle s'y dissoudrait en partie.

On essore avec soin, et lave rapidement à l'eau, puis on dissout dans 950 cc d'eau distillée, en faisant bouillir à feu doux et en agitant fréquemment pour activer la dissolution. Quand la solution est refroidie vers 60° on ajoute un blanc d'œuf battu dans 50 cc d'eau, on mélange et on porte à l'autoclave à 118° pendant 15 m.

Cette opération est le collage, et a pour but la clarification de la solution gélifiée : l'albumine de l'œuf entraîne toutes les particules solides, et, après filtration on obtient un liquide parfaitement limpide. (Le mieux est de filtrer sur filtre Chardin mouillé dans l'autoclave chaud, le couvercle seulement posé. Pour éviter l'évaporation il est bon de recouvrir l'entonnoir d'une plaque de verre).

Verser alors dans l'entonnoir à répartition un mélange intime d'un volume de gélose filtrée chaude et d'un demi-volume de bouillon de levure glycérolée chaude et répartir rapidement dans des tubes préalablement stérilisés au four Pasteur, en versant trois doigts dans chaque tube.

Stériliser à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes. Laisser refroidir l'autoclave jusqu'à 100°, ouvrir aussitôt, la vapeur qui sort sèche rapidement les cotons. Dès que tout est sec, sortir les tubes et les incliner de façon à conserver un culot d'un centimètre de haut et une pente de gélose s'arrêtant au moins à un centimètre du coton. Les tubes doivent rester couchés 24 heures avant d'être utilisés.

Pour préparer la gélose au jus de sorbes ou de cerises, on opère comme précédemment jusqu'après la filtration de la gélose, mais on ajoute seulement un tiers de jus de fruit, préalablement chauffé à 60°, à la gélose et on répartit comme précédemment. On stérilise à l'autoclave pendant 10 minutes à 105°. L'acidité du jus de fruits oblige à employer une proportion plus grande de gélose.

§ 5. — Facteurs agissants sur la croissance.

a) Température.

La vitesse de croissance de *Bacterium xylinum* est très grandement influencée par la température. On n'obtient guère de reproduction avant 15°, les cultures sont de plus en plus rapides jusqu'à 28°, où elles atteignent leur maximum et la vitesse est à peu près cons-

tante jusqu'à 32°. La bactérie vit encore à 36°, mais toute division cesse pratiquement vers cette température.

b) Concentration.

La concentration en aliment azoté joue un certain rôle.

D'après Marjorie STEPHENSON, dans un milieu peptoné à moins de 2 ‰, « le temps de génération » est inversement proportionnel à la concentration en peptone, au-dessus de 4 ‰ des concentrations plus élevées sont à peu près sans effet sur la croissance.

Avant de se fixer sur l'asparagine, TARR et H. HIBBERT ont fait une intéressante étude sur l'influence des sources d'azote. Dans les milieux sur thé sucré, c'est le thé qui est la source d'azote, et, si nous avons obtenu des cultures sur eau ordinaire (+ glucose), c'est parce qu'elle contenait des nitrates et des nitrites.

Nous avons toujours utilisé des autolysats de levure de même richesse en extrait sec (5 ‰), justement pour pouvoir comparer entre eux les résultats obtenus.

La concentration en source de carbone est d'une très grosse importance. Dans notre étude de la croissance de *Bacterium xylinum* sur le β -glucoheptitol, nous verrons que les concentrations optima sont 3 et 4 %. Ce sont les concentrations utilisées en général par les expérimentateurs. BROWN emploie des milieux à 3 %, G. BERTRAND le plus souvent des milieux à 5 %, TARR et H. HIBBERT à 2 % (sauf pour l'alcool propylique qu'ils emploient à 0,5 %).

Le milieu nutritif par excellence de *Bacterium xylinum* est le jus de fruits. A quoi donc est due cette supériorité ? Nous avons vu qu'un jus trop chauffé est « antiseptique » pour la bactérie, et que le jus de sorbes est plus fragile que le jus de cerises. G. BERTRAND croit qu'il se forme une substance antiseptique, nous pensons plutôt qu'une substance nutritive est détruite par la chaleur, substance qui est peut-être une vitamine.

C'est WILDIERS (1901) qui montra le premier la présence d'un facteur inconnu, le facteur « bios » : il emploie un milieu inorganique où le carbone et l'azote sont fournis par le saccharose et l'ammoniaque, il ne peut obtenir de croissance de la levure en employant des quantités de semences inférieures à un certain minimum de cellules par unité de volume. HOSOYA et KUROYA se sont attachés à l'étude

de ce facteur croissance pour un grand nombre de bactéries et ont obtenu des résultats remarquablement intéressants (1923).

Certains sels ont été employés dans les cultures de *Bacterium xylinum*, le chlorure de potassium, les phosphates, mais leur rôle n'est pas élucidé (TARR et HIBBERT, 1930).

G. BERTRAND et R. SAZERAC ont montré que l'activation de la fermentation acétique peut être provoquée par la présence de sels de manganèse (1913).

c) pH.

Bacterium xylinum n'est pas très exigeante vis-à-vis du pH de son milieu nutritif, nous avons vu en effet qu'elle pousse sur le jus de sorbes ou de cerises qui sont très acides et sur autolysat de levure qui a un pH voisin de la neutralité.

Il ne faut pas en conclure à l'indifférence de cette bactérie vis-à-vis du pH.

En effet, à un pH = 3 et à un pH = 7 le glycérol ne donne pas de dioxyacétone, selon A. VIRTANEN et Brita BÄRLUND (1926), le pH optimum de cette réaction semble être voisin de 5,6 l'optimum étant 5 pour la croissance.

HENNEBERG ajoute des phosphates acides au milieu nutritif synthétique employé dans la culture de bactéries acétifiantes, et leur attribue une influence favorable, ceci est sans doute dû au fait qu'ils tamponnent le milieu au pH voulu (1897-98).

VIRTANEN et Brita BÄRLUND préconisent les tampons au glyco-collé (1926).

d) Épaisseur de la couche de liquide.

Bacterium xylinum est très avide d'oxygène, c'est en effet une bactérie oxydante. Il faut donc que l'air puisse pénétrer à l'intérieur du liquide.

D'ailleurs, nous avons vu que, dans toutes les cultures, la zooglycée cherche à atteindre la surface et à s'y maintenir en plein contact avec l'air, aussi l'épaisseur de la couche de liquide est d'une importance primordiale, qui influe énormément sur la marche de la réaction. Dans notre préparation d'un sucre réducteur à partir du β gluco-heptitol, nous verrons que les rendements, très mauvais

pour une couche de 5 cm d'épaisseur, sont excellents pour une couche de 3 cm.

Il ne faut pas employer cependant des couches trop minces : « une couche de 1 cm provoque au début une oxydation très rapide mais, plus tard, une couche de 3 cm a une action favorable sur la réaction » VIRTANEN et Brita BÄRLUND (1926), BERNHAUER et SCHÖN (1928), emploient des couches minces de 1 à 2 cm, mais il faut alors suivre l'oxydation de très près pour l'arrêter avant que le produit formé soit attaqué par la bactérie.

c) Qualités nécessaires aux souches utilisées pour l'ensemencement.

Les cultures qui servent aux ensemencements doivent être, de préférence, âgées de 5 à 15 jours, ce sont les plus vigoureuses. Il suffit cependant de repiquer la bactérie toutes les cinq semaines pour la conserver en bonne santé. Il est bon d'autre part d'accoutumer la bactérie au milieu qui doit être étudié.

Onensemence une bactérie provenant de jus de cerises (donc très oxydante) sur le milieu considéré et après quelques jours on repique dans les matras d'étude. C'est ce qu'on appelle faire un pied de cuve.

Il faut employer de très petites quantités de semence, comme le démontre l'expérience suivante : onensemence sur glycérol à 4 % à partir d'une culture de 6 jours sur glycérol, en employant des quantités décroissantes de semence pure de 1 cc à 0,05, puis d'une dilution de 1 cc de cette semence dans 10 cc d'eau distillée, et enfin d'une dilution au 1/100 de la même semence, on constate que plus faible est la quantité de semence employée et plus vite la culture commence. Si même, au lieu d'ensemencer par le liquide, on emploie un morceau de zooglée, la culture est pénible.

TARR et HIBBERT recommandent d'employer des dilutions au 1/10 : 0,1 de liquide d'une culture de 8 jours dans 10 cc d'eau distillée.

§ 6. — Place de *Bacterium xylinum* dans la classification.

B. xylinum qui transforme l'alcool éthylique en acide acétique est donc une bactérie acétifiante et, dès 1901, alors que seules des bactéries acétiques, *B. aceti* et *B. xylinum* étaient connues, G. BER-

TRAND et R. SAZERAC classaient les bactéries acétiques en bactéries cétogènes et bactéries acétogènes, chaque groupe comprenant seulement un représentant.

La famille s'est bien agrandie depuis et dans leur projet de classification des bactéries acétiques S. HERMANN et P. NEUSCHEUL les classent en bactéries cétogènes et acétogènes suivant la manière dont elles s'attaquent aux alcools et les transforment ou non en dérivés cétoniques (1931). Ils citent 8 bactéries acétogènes : *B. acetii*, *B. pasteurianum*, *B. acetosum*, *B. ranscens*, *B. ascendens*, *B. vini acetati*, *B. kuntzingianum* et *B. ascendens* (HENNEBERG) et 5 bactéries cétogènes : *B. gluconium*, *B. xylinum*, *B. xyliñoïdes*, *B. orleanse*, *B. acetii* (HANSEN).

Tous ces microorganismes attaquent les alcools étylique et propylique, tous sauf *B. ascendens* oxydent le glucose en acide gluconique. Le lévulose est oxydé seulement par *B. gluconium*. *B. gluconium*, *xyliñoïdes* et *acetii* (HANSEN) excrètent de la sucrase. Aucune des bactéries n'est capable de s'attaquer au maltose et au lactose.

Nous croyons pouvoir joindre aux bactéries cétogènes : *acetobacter suboxydans* de KLUYVER et LEEW (1924) *B. dioxyacetinum*, découverte par Artturi VIRTANEN et Brita BÄRLUND (1926), et peut-être *B. industrium acetobacter* de TEIZO TAKAHASAI et TOSHINOBU ASAI (1931).

Ce sont là des organismes nettement différents de *B. xylinum*. Il ne s'agit pas de variations d'une même bactérie, de celle dont la découverte n'est limitée que par la patience du chercheur. D'ailleurs s'il est facile de trouver de nombreuses espèces de levures, de moisissures, de ferments, d'algues qui donnent lieu à des représentants innombrables et dont chaque individu est quelquefois une espèce à lui seul, il est impossible de trouver des « familles » de *Bacterium xylinum*. C'est en effet une bactérie bien différenciée, aux caractères morphologiques nettement définis, aux propriétés chimiques immuables et dont la membrane a une composition absolument particulière. Evidemment nous obtiendrons quelques variantes de *Bacterium xylinum* suivant les origines : diverses mères de vinaigres donneront des bactéries qui ne seront pas absolument identiques, les cultures seront plus ou moins colorées, les bâtonnets seront plus ou moins grands, les vitesses d'oxydation des ali-

ments seront un peu différentes mais ce seront là des Bactéries semblables. Elles ne diffèrent pas plus que ne diffèrent entre eux les descendants d'une même souche ensemencés sur divers milieux et quelquefois moins, puisque nous avons vu que la bactérie perd ou acquiert ses propriétés oxydantes suivant le milieu sur lequel elle est cultivée.

Nous n'insisterons pas sur les bactéries acétiques acétogènes qui sont, par leur définition même très différentes de *Bacterium xylinum*. Parmi les bactéries céto-gènes il en est trois qui sont particulièrement voisines de *Bacterium xylinum*, ce sont : *Acetobacter suboxydans*, *B. gluconium* et *B. dioxyacetonum*.

Selon KLUYVER lui-même (1931) *Acetobacter suboxydans* est presque identique à *Bacterium xylinum*, cependant, comme l'indique ce savant, ces deux microorganismes sont bien d'espèce différente, car *Acetobacter suboxydans* dans n'importe quelles conditions, borne son action à la déshydrogénation d'un groupement alcool secondaire, cependant que *B. xylinum* peut s'il est bien aéré, aller au delà, et brûler complètement la cétose en gaz carbonique et eau.

KLUYVER s'appuie sur cette propriété d'*A. suboxydans* pour en préconiser l'usage dans la préparation de la dioxyacétone, aliment sucré des diabétiques, (KERMACK, LAMBIE, SLUTER, 1926), préparation qui nécessite une surveillance sévère lorsqu'elle est effectuée par *B. xylinum* et à laquelle *A. suboxydans* donnerait une grande sécurité.

B. gluconium a été découverte par SIEGWART HERMANN (1927-1928) dans le Kombucha où elle se trouve associée à *B. xylinoides* et à *B. xylinum*. Le Kombucha ou champignon du Japon se produit sur les vieux restes de thé. Nous en avons obtenu de cette manière. Comme nous l'avons déjà dit, on utilise en Tchékoslovaquie, en Bulgarie et en Russie un agglomérat de champignons pour préparer une boisson fermentée appelée en Russie le Theekvas, à partir du thé sucré. MARKOFF et ZLATAROFF (1926) ont étudié longuement « la mycologie et la biochimie du champignon japonais ». Outre quelques infections : Hyphomycetes, *Fungi imperfecti*, le champignon japonais utilisé couramment en Bulgarie contient, des Saccharomycètes en particulier *Saccharomyces Meyer*, des *Acetobacter* : *A. melange-nium Beijerinck* et *B. xylinum*. Ces microorganismes vivent en métabiose (les auteurs après avoir analysé la flore du Kombucha

ont pu en faire la synthèse) La boisson préparée à l'aide de ces champignons est utilisée en thérapeutique, et MARKOFF et ZLATAROFF attribuent son pouvoir curatif à la vitamine C dont ils ont reconnu la présence.

Or suivant ces même auteurs le saccharose présent dans la solution de thé sucré est dédoublé en glucose et fructose par le champignon japonais ; nous savons que *B. xylinum* transforme le glucose en acide gluconique puis en acide-5-céto-gluconique, isomère de l'acide hexuronique. Or de récents travaux indiquent l'analogie de ce dernier corps et d'un des constituants de la vitamine C, et le travail de MARKOFF et ZLATAROFF vient à l'appui de ces recherches.

S. HERMANN assure que bactériologiquement le Theekvas n'est pas identique au Kombucha, et en effet ses résultats diffèrent de ceux de MARKOFF et ZLATAROFF. HENNEBERG considère Theekvas comme un champignon japonais ou mandchourien et le croit composé de *B. xylinum* et de levure *Pombe*.

S. HERMANN emploie comme milieu de culture une infusion de thé à 5 gr. par litre additionnée de 75 gr. de sucre de canne. Ensemencé par le Kombucha il se produit rapidement une épaisse membrane cellulosique, la méthylxanthine ne change pas, la caféine diminue très peu, le thé sert seulement comme source d'azote, et le sucre qui disparaît est utilisé à la préparation d'acides que l'on retrouve dans le milieu de culture et à la confection de la membrane.

La quantité d'acide gluconique formée étant très supérieure à celle que produirait *Bacterium xylinum* seul, Siegwart HERMANN analyse le Kombucha et y trouve en plus de *Bacterium xylinum* et *xylinoides*, une troisième espèce qui transforme le glucose en acide gluconique à une vitesse très supérieure à *Bacterium xylinum*, d'où le nom qu'il lui donne de *B. gluconium*.

Hugo HAEHN et Margot ENGEL ont aussi travaillé avec le Kombucha, mais sans analyser la flore. (1929)

Bacterium dioxycetoneum a été isolée par VIRTANEN et Brita BÄRLUND du jus de betterave (1926). Ils lui ont donné ce nom en raison de sa propriété d'oxyder profondément la glycérine en dioxycétone avec un rendement très élevé. Cette bactérie diffère très distinctement de *Bacterium xylinum* : elle est mobile, ne forme pas de pellicules résistantes, et les minces pellicules formées ne donnent pas

la réaction de la cellulose. De plus il existe de légères différences entre les températures et les pH optima.

Quelques autres microorganismes se rapprochent beaucoup de *Bacterium xylinum*.

Le premier en date a été utilisé en 1857 par BERTHELOT, qui, par son intermédiaire, transforme la glycérine en sucre, opération qu'il réalise à l'aide de tissu testiculaire. Mais il ne peut déterminer la raison de cette réaction et c'est G. BERTRAND qui montre en 1901 que « les testicules du chien, du lapin, du cobaye, du coq, ferment dans certains cas, même à l'état normal, des microbes capables d'oxyder la glycérine au contact de l'air et de fournir alors de la dioxyacétone. BOUTROUX en 1886 réalise la préparation du sel de calcium de l'acide oxy-gluconique par l'action d'un microbe particulier perdu depuis, c'est peut-être *Acetobacter suboxydans*.

En 1901 R. SAZERAC a découvert dans le vinaigre de vin une bactérie oxydante qui n'est pas acétifiante et, qui de plus, si elle attaque bien le sorbitol et l'érythritol, est impuissante sur le mannitol.

A. FERNBACH a signalé l'analogie de certaines propriétés du *Tyrophthrix tenuis* et de *Bacterium xylinum* : le tyrophthrix agissant sur le glycérol produit aussi de la dioxyacétone qu'une action prolongée du microorganisme attaque et transforme en méthylglyoxal, formaldéhyde et acide acétique ; il oxyde également le sorbitol en sorbose (1910).

CHAPITRE II

LES ALIMENTS CARBONÉS DE *B. XYLINUM*

- § 1. — Introduction.
- § 2. — Les alcools simples.
- § 3. — Les polyalcools.
- § 4. — Esters et éthers de polyalcools.
- § 5. — Oses et osides.
- § 6. — Aldéhydes et acides.

§ 1. — Introduction.

En étudiant la place de *B. xylinum* dans la classification des bactéries acétiques, nous avons déjà vu que tous les aliments ne lui conviennent pas et qu'elle utilise ceux qui lui conviennent de façon absolument particulière. Déjà BROWN (1886) dit que *B. xylinum*, pousse sur l'alcool éthylique, le glucose, le mannitol, mais ne peut pousser sur l'amidon. La question du produit formé à partir de l'aliment est primordial. G. BERTRAND et VOTOCEK, en particulier, ont employé *B. xylinum* comme un véritable réactif chimique.

Nous n'avons vu jusqu'à présent que les milieux naturels destinés à conserver aux souches leur activité et les bases des milieux synthétiques qui ne permettent qu'une faible croissance de la bactérie; le milieu de TARR et HIBBERT étant même composé de telle sorte qu'il ne donne naissance à aucune culture. Il nous reste à passer en revue les différents aliments carbonés utilisés par *B. xylinum* et à voir quelles transformations elle leur fait subir.

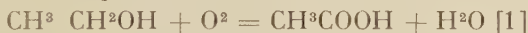
De très nombreux chercheurs se sont attachés à l'étude des transformations effectuées par *B. xylinum* dans le but d'étudier la membrane formée, dans celui de produire de nouveaux corps ou

dans un but uniquement spéculatif. Nous verrons les différents corps étudiés : les alcools de la série grasse, les polyalcools, leurs esters et éthers, les oses et les osides, les aldéhydes et les acides ; ces derniers n'ont guère été étudiés en eux-mêmes mais uniquement parce que la bactérie s'est trouvée en leur présence après les avoir produits à partir d'autres composés.

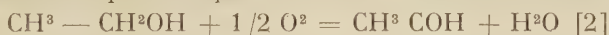
§ 2. — Alcools simples.

B. xylinum est par définition même, une bactérie acétique : elle pousse très bien sur l'alcool éthylique (BROWN 1886). L'alcool propylique est également alimentaire pour la bactérie, cependant que l'on n'obtient aucune culture sur l'alcool méthylique, les alcools amylique et butylique (TARR et HIBBERT). Ce fait est d'ailleurs conforme à la loi générale d'action des alcools : ceux-ci à partir de l'alcool éthylique, sont d'autant plus antiseptiques que le nombre de leurs atomes de carbone est plus élevé.

La marche de l'attaque des alcools par *B. xylinum* se propage selon toute probabilité suivant le même mode que celui des autres bactéries acétiques :



NEUBERG et NORD (1919) ont isolé l'acétaldéhyde comme terme intermédiaire. La première partie de la réaction est donc la suivante :



mais, la transformation d'aldéhyde acétique en acide acétique peut se faire de deux façons différentes, soit directement [3], soit par dismutation [4]



NEUBERG et WINDICH (1925), NEUBERG et MOLINARI (1926) affirment que la dismutation est le seul processus suivi, l'opération disent-ils, procède par une suite d'oxydations et de dismutations jusqu'à ce que tout l'alcool soit transformé en acide.

D'après WIELAND et BERTHO (1928), BERTHO (1929-1932) BERTHO et BASU (1931), ce processus n'est qu'accessoire et le processus essentiel est l'oxydation directe [3].

B. xylinum, contrairement aux autres bactéries ne borne pas son action à transformer l'alcool éthylique en acide acétique, et dans les

expériences de longue durée, on n'obtient pas d'acide acétique ; cet acide est brûlé en gaz carbonique et eau (G. BERTRAND). Pour cette raison *B. xylinum* est redouté des vinaigrieres.

§ 3. — Polyalcools.

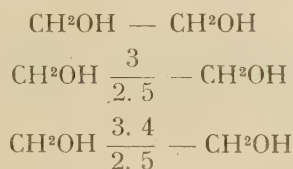
Dès le début de son travail sur l'oxydation du sorbitol par *B. xylinum* (1896), G. BERTRAND s'attache à l'étude des isomères du sorbitol et est frappé de voir que si le mannitol est bien alimentaire pour la bactérie, il en est tout autrement du dulcitol. Un bouillon additionné de ce polyalcool « résiste à l'infection, la bactérie d'abord languissante, finit par y mourir sans transformer ni le dulcitol qu'on retrouve tout entier, ni pour ainsi dire aucune des autres substances qui l'accompagnent. »

Voilà déjà un fait remarquable, une simple différence stéréochimique entre le dulcitol, le mannitol, et le sorbitol empêche le développement de *B. xylinum*, et, tout naturellement G. BERTRAND s'attaque à l'étude d'autres polyalcools : glycol, glycérol, l-érythritol, l-xylitol, l-arabitol, perséitol, volémitol. Cinq de ceux-ci sont attaqués ce qui porte à sept le nombre de polyalcools oxydables étudiés en 1904.

Nous les avons réunis dans le tableau suivant en regard de leur produit d'oxydation :

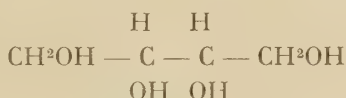
$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — } \frac{\text{CH}^2\text{OH}}{2}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO — CH}^2\text{OH}$
glycérol	dioxyacétone
$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — } \frac{\text{CH}^2\text{OH}}{2.3}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO — } \frac{\text{CH}^2\text{OH}}{3}$
l-érythritol	d-érythrulose
$\text{CH}^2\text{OH} \frac{2.3}{4} \text{ CH}^2\text{OH}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO } \frac{3}{4} \text{ CH}^2\text{OH}$
l-arabitol	
$\text{CH}^2\text{OH} \frac{4}{2.3.5} \text{ CH}^2\text{OH}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO } \frac{4}{3.5} \text{ CH}^2\text{OH}$
d-sorbitol	d-sorbose
$\text{CH}^2\text{OH} \frac{4.5}{2.3} \text{ CH}^2\text{OH}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO } \frac{4.5}{3} \text{ CH}^2\text{OH}$
d-mannitol	d-lévulose
$\text{CH}^2\text{OH} \frac{4.5}{2.3} \text{ CH}^2\text{OH} \text{ — CH}^2\text{OH}$	$\text{CH}^2\text{OH} \text{ — CO — } \frac{4.5}{3} \text{ CHOH — CH}^2\text{OH}$
perséitol	perséulose
$\text{CH}^2\text{OH} \frac{5}{1.2.3.4} \text{ CH}^2\text{OH}$	$\text{C}^7\text{H}^{14}\text{O}^7$
volémitol	volémulose

D'autre part G. BERTRAND : « constate que le glycol, le l-xylitol, comme d-dulcitol



ne sont pas attaqués par la bactérie », et il énonce la règle suivante : « seuls sont attaqués les polyalcools renfermant un groupement secondaire dans leur molécule et de plus, l'oxyhydrile OH doit être disposé de telle façon que d'un même côté de la chaîne, il ne soit pas au voisinage d'un atome d'hydrogène faisant partie d'un groupement semblable ».

Il spécifie même qu'une seule fonction peut être oxydée par la bactérie. Ainsi la formule de constitution de l'érythritol :

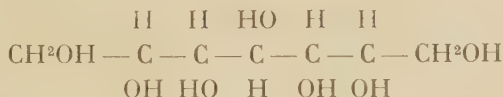


implique l'obtention de deux cétooses :

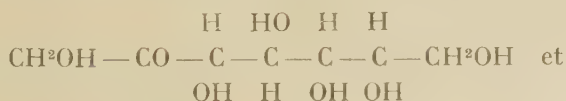


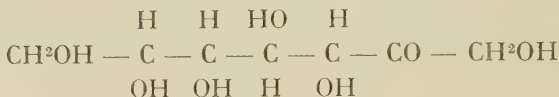
or une seule substance est obtenue, la première, le d-érythrulose.

L'oxydation de l' α glucoheptitol réalisée en 1928 par G. NITZBERG et G. BERTRAND se produit de la même façon. D'après la formule :



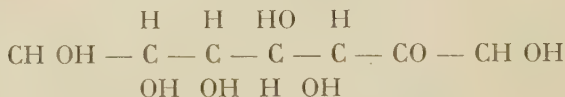
Les groupements secondaires 2 et 5 sont oxydables, cependant les auteurs n'ont obtenu qu'un seul cétoose, dont ils n'ont pu déterminer la formule avec certitude, ils hésitent entre :



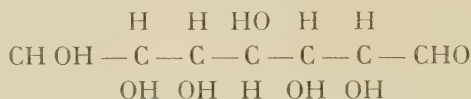


mais un travail très intéressant d'AUSTIN conclut à l'exactitude de la première et il appelle le sucre de G. NITZBERG et G. BERTRAND l- α glucoheptose :

AUSTIN prépare le d- α glucoheptulose :

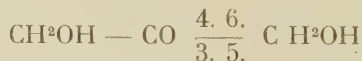


à partir du d- α glucoheptose :



en employant un procédé mis au point par WOLFROM et LEVIS (1928) de la méthode d'isomérisation des aldoses en cétooses de LOBRY et BRUYN (1895) et LOBRY et BRUYN et ALBERDA VAN EKENSTEIN (1895, 1897) sous l'influence des alcalis. Il vérifie les résultats par le procédé de MONTGOMERY et HUDSON (1930) et constate que l'énantiomorphe de cet heptulose est identique au sucre de NITZBERG et G. BERTRAND. Comme il ne peut y avoir ambiguïté dans la formule du d. α -glucoheptulose, par suite de la méthode utilisée pour le préparer, le cétoose de G. NITZBERG et G. BERTRAND est bien le l- α glucoheptulose.

Nous verrons, à la suite de ce travail, que nous avons pu réaliser l'oxydation du β glucoheptitol $\text{CH}^2\text{OH} \frac{4.6}{2.3.5.} \text{CH}^2\text{OH}$ avec obtention d'un sucre cétonique, dont la formule est :



si l'on applique la règle de G. BERTRAND.

Nous avons vu que ni G. BERTRAND, ni HENNEBERG (1898) n'ont pu oxyder le glycol par *B. xylinum*. VISSER'T HOOF dit avoir réussi (1926) mais il ne détermine pas les produits d'oxydation. Nous nous sommes efforcée de répéter l'expérience de ce dernier : malgré de nombreux essais, nous n'avons pu obtenir de résultat positif pas plus qu'avec le méthyl ou l'éthylglycol. TARR et HIBBERT

ont également obtenu un résultat négatif avec ce dernier polyalcool (1930):

KLING oxyde le propylglycol:

$\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$, en acétyl-carbinol

ou acétol $\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CH}^2\text{OH}$, (1899)

et le 2.3. butylèneglycol. (1905): $\text{CH}^3 - \text{CH}^3$
2.3.

oxydé également par VISSER'T HOOF (1926) en acétoïne:

$\text{CH}^3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}^3$.

VISSER'T HOOF estime que l'oxydation du 2.3. butylène-glycol que KLING et lui-même ont réalisée est en contradiction avec la règle de G. BERTRAND. Irène NEUBERG se range à cette opinion. Nous considérons cependant que la règle interdit seulement au voisinage de la fonction alcool secondaire oxydable une fonction alcool secondaire disposée à l'inverse de la première. Ainsi il ne faut pas avoir:



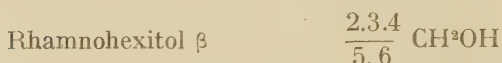
cependant il n'est pas nécessaire que la fonction alcool secondaire oxydée soit au voisinage d'une autre fonction alcool secondaire: le glycérol est bien oxydée en dioxycétone par G. BERTRAND lui-même.

Tableau 1.
ATTAQUES DES HEXITOLS
D'après la règle de G. BERTRAND.

Sorbitol	$\frac{4}{2.3.5.}$	+
Mannitol	$\frac{4.5.}{2.3.}$	+
Dulcitol	$\frac{3.4.}{2.5.}$	0
Talitol	$\frac{3.4.5.}{2}$	(+)
Iditol	$\frac{2.4.}{3.5.}$	(0)
Altrol ?	$\frac{2.3.4.5.}{2.3.4.5.}$	(+)

Les résultats envisagés jusqu'à présent sont donc conformes à la règle de G. BERTRAND, elle n'est cependant pas d'une application absolument générale, comme dit Irène NEUBERG (1932), « la règle de G. BERTRAND ne détermine pas que tel polyalcool *doit* être oxydé mais qu'il *peut* être oxydé. »

En effet, M. VOTOCEK et ses collaborateurs F. VALENTIN et F. RAC (1930) n'ont jamais réussi à cultiver *B. xylinum* ni sur le rhodéitol, ni sur le rhamnitol, ni sur les rhamnohexitol α et β :



La rhamnite gauche « nonobstant sa configuration favorable », dit E. VOTOCEK, résiste à l'action oxydante de la bactérie du sorbose, bien que nous eussions opéré avec des cultures qui oxydaient énergiquement le mannitol. Les auteurs ont fait agir la bactérie simultanément sur trois solutions :

A. 75 g. d'eau de levure à 0,5 % + 2,5 g. de mannitol.

B. 75 g. — — — + 1,25 g. — et 1,25 g. de rhamnitol.

C. 75 g. — — — + 2,5 g. de rhamnitol.

Après quinze jours au thermostat à 28°, A contient une belle zoogée d'une épaisseur de 1 centimètre, et a un pouvoir réducteur de 70 %, B a une zoogée de 7 mm. mais seul le mannitol est oxydé quant à C elle contient seulement une zoogée gélatineuse et n'est pas du tout oxydée.

E. VOTOCEK observe également la passivité de *Bacterium xylinum* vis à vis de l'arabitol que nous avons vu Gabriel BERTRAND ranger au nombre des polyalcools attaqués. De tous ces résultats il conclut : « Ce n'est pas la configuration stéréochimique qui décide de l'oxydabilité ou non d'un alcool plurivalent par la bactérie du sorbose, mais encore la série homologue à laquelle il appartient. »

D'ailleurs en 1904, les méthylpentitols, dont à cette époque le rhamnitol seul était connu, n'avaient pas été pris en considération.

Justement TARR et H. HIBBERT croient que la présence d'un

simple groupement méthyl empêche la formation de la zoogée : ils ont un résultat négatif avec l' α méthylglycérol, l' α méthylglucoside, le méthylpentose, le rhamnose. Le groupement Cl. retarde également la croissance.

Tableau 2.

GLYCOLS

CORPS ATTAQUÉ	CORPS NON ATTAQUÉ	CORPS OBTENU	AUTEURS	
			POUR	CONTRE
Glycol	Glycol	?	VISSERT' HOOF (1926) HENNEBERG (1926) TARR et HIBBERT (1931)	G. BERTRAND (1896-1904)
				M. COZIC (1933)
				M. COZIC (1933)
				TARR et HIBBERT (1930)
	Méthyl-glycol Ethyl-glycol			M. COZIC (1933)
Propyl-glycol.		Acétol	KLING (1899)	
Butylène glycol		Méthyl-acétyl carbinol	KLING (1905) VISSERT'HOOF (1926)	

§ 4. — Esters et éthers de polyalcools.

Les esters et éthers de polyalcools étudiés jusqu'à présent sont des dérivés du glycérol

Irène NEUBERG (1932) a oxydé les éthers mono-méthylique et mono-éthylique du glycérol par *B. xylinum* et *Acetobacter suboxydans*.



Elle obtient la dioxycétone-mono-méthyl-éther et la dioxycétone-mono-éthyl-éther :



Nous avons essayé de faire pousser *B. xylinum* sur les acétines du glycérol à 4 % sur autolysat de levure à 5 ‰. La monoacétine $\text{CH}^2(\text{OCOCH}^3)\text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$ donne de très belles cultures et on obtient la cétone correspondante $\text{CH}^3(\text{O CO CH}^3)\text{CO} - \text{CH}^2\text{OH}$. Cependant la di et la triacétine ne permettent aucune croissance :



Nous pensons que la croissance sur le dérivé monoacétiné du glycérol examiné ci-dessus n'est pas plus opposée à la règle de G. BERTRAND que la croissance de *B. xylinum* sur le propylglycol et le 2.3. butylèneglycol.

Tableau 3.

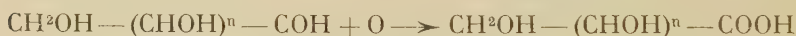
ATTAQUE DES DÉRIVÉS DU GLYCOL ET DU GLYCÉROL PAR
B. XYLINUM

		Glycol	Glycérol
Ethers	Alcool	0	+
	— méthoxy	0	+
	— éthoxy	0	+
Esters	Monoacétine.		+
	diacétine		0
	triacétine		0
	monoformine	0	
	monochlorhydrine	0	?

§ 5. — Oses, Osides.

D'après G. BERTRAND, tous les sucres réducteurs, aldéhydiques ou cétoniques, sont alimentaires pour la bactérie, mais ne donnent jamais de cultures abondantes, les zoogléas ne deviennent pas opaques et blanches comme sur le glycérol.

1°. — Les aldoses sont tous transformées quantitativement en acides alcools.



Le glucose est transformé en acide gluconique, le galactose en acide galactonique, le xylose en acide xylonique, l'arabinose en acide arabonique, ces deux derniers avec un moins bon rendement que les premiers (G. BERTRAND).

La bactérie ne fait pas de différence, dit G. BERTRAND, entre « les sucres qui renferment le groupement que nous savons favorable au développement de la bactérie et ceux qui en sont dépourvus. »

2°. — Les cétooses sont détruites lentement sans qu'il soit possible de reconnaître de dérivé caractéristique. C'est avec le fructose que TARR et HIBBERT obtiennent les plus belles membranes. L'inconvénient de cette propriété est que les sucres cétoniques produits

par oxydation des polyalcools sont détruits par action prolongée de la bactérie.

« L'existence d'un certain groupement non saturé, aldéhyde ou cétone, dont l'oxydation dégage en général plus de chaleur que la transformation d'un alcool secondaire en cétone, suffit pour justifier une action générale ». (G. BERTRAND, 1904).

3°. — *Les osides.*

Quoique BROWN n'ait pu cultiver *B. xylinum* sur le saccharose, ce sucre est alimentaire pour la bactérie comme l'ont montré MARKOFF et ZLATAROFF (1926), TARR et H. HIBBERT (1930), Siegwart HERMANN et Paul NEUSCHUL (1931).

Le lactose et le maltose ne permettent pas la croissance de *B. xylinum*, et les expérimentateurs cités ci-dessus sont d'accord sur ce point, ainsi que HENNEBERG (1926). Au sujet du raffinose les avis sont partagés, HENNEBERG, TARR et H. HIBBERT sont pour l'action de *B. xylinum* sur le raffinose, alors que HERMANN et P. NEUSCHUL s'ils obtiennent bien une croissance, n'ont qu'une membrane gélatineuse.

Le saccharose est transformé en sucre interverti et la croissance de *Bacterium xylinum* rend le milieu acide, cependant que dans la solution additionnée de raffinose on obtient une faible réaction de Fehling (S. HERMANN et P. NEUSCHUL) ;

§ 7. — Aldéhydes et acides.

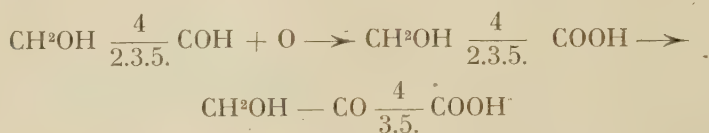
1°. — *Aldéhydes.*

Aucune aldéhyde n'a été étudiée en elle-même, cependant des traces d'aldéhyde éthylique et d'aldéhyde propy^{ion}lique permettent la croissance de *B. xylinum* : en effet la bactérie pousse très bien sur l'alcool éthylique et sur l'alcool propylique ; la transformation d'alcool en acide passe par l'aldéhyde comme terme intermédiaire, TARR et HIBBERT (1930) emploient même des traces d'alcool éthylique pour favoriser la formation de la membrane.

2°. — *Acides.*

Les acides gras n'ont jamais été utilisés comme aliment de croissance de *B. xylinum*, cependant que les acides dérivés des sucres et obtenus par action de *B. xylinum* sur les aldoses ont été étudiés avec soin.

Pour ceux-ci l'action de la bactérie est différente suivant la formule stéréochimique : ceux qui comprennent le groupe oxydable suivant la règle de G. BERTRAND voient ce groupe alcool secondaire se transformer en cétone. Par exemple à partir de l'acide gluconique on obtient l'acide 5 céto-gluconique identique à celui découvert par BOUTROUX (1888).

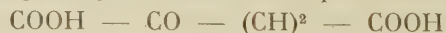


et isomère de l'acide glycuronique $\text{COOH} \frac{4}{2.3.5.} \text{COH}$ qui est un corps très voisin d'un des constituants de la vitamine C.

BERNHAEUER et SCHÖN (1929) ont préparé l'acide oxy-gluconique de cette manière. Hugo HAEHN et Margot ENGEL en cultivant *Bacterium xylinum* sur un milieu qui contient uniquement du glucose trouvent en plus de l'acide gluconique, un peu d'acide lactique et des traces d'acide formique (1929), ZOPF décèle même des traces d'acide oxalique.

Sieglwart HERMANN (1928-1929) ne réussit à oxyder que les sels de l'acide gluconique, et non l'acide gluconique lui-même, et il utilise ce critérium pour distinguer *Bacterium xylinum* de *Bacterium gluconium* isolée du « Kombucha » qui elle justement « oxyde l'acide gluconique en acide 5 céto-gluconique. »

Ryuzo IWATSURU (1926) inspiré par le travail de NEUBERG et VINDISCH sur les carboxylases des bactéries d'acide acétique (1925) a fait des essais pour voir si *Bacterium xylinum* qui appartient au groupe des bactéries acétifiantes, contient une carboxylase qui soit susceptible de décomposer les acides cétoniques compliqués. Comme exemple, Ryuzo IWATSURU a pris l'acide céto-glutarique :



et a pu prouver qu'il est décarboxylé très facilement et transformé en acide succinique.

Il n'y a aucun doute de cette transformation : Ryuzo IWATSURU s'appuie de plus sur un travail de NEUBERG et RINGER (1915) qui montre que l'on peut conserver l'acide céto-glutarique en solution stable et qu'il ne se transforme pas de lui-même en acide succinique.

Tableau 4.

CRÔISSANCE DE *B. XYLINUM* SUR DIVERS ALCOOLS ET SUCRES

NOMBRE DE FONCTIONS ALCOOLS	1	2	3	4	5	6	7
C ₁	Méthyl 0						
C ₂	Ethyl +	Glycol 0					
C ₃ normal	Propyl +	Trimé- thylène glycol ?					
C ₃ iso	Isopropyl (+)	Propyl- glycol +	Glycérol +				
C ₄ normal	Butyl 0		Méthyl- glycérol 0	Erythri- tol +			
C ₄ iso	Isobutyl ?	2.3. Bu- tylène +					
C ₅	Amyl 0			Pentoses +	Arabitol + Xylitol 0		
C ₆					Rhamni- tol 0 Aldoses + Cétoses +	Mannitol + Sorbitol + Dulcitol 0	
C ₇						Rhamno- hexite 0	Perséitol + Volemitol + α et β glucohep- titol +

CHAPITRE III

PREPARATION DE DIVERS SUCRES ET POLYALCOOLS

Introduction

§ 1. — Préparation des lactones α et β glucoheptoniques.

a) Préparation des nitriles.

b) Préparation, séparation et propriétés des lactones.

§ 2. — Hydrogénation des lactones glucoheptoniques en heptitols.

a) α glucoheptitol.

b) β glucoheptitol.

§ 3. Oxydation du β glucoheptitol par *B. xylinum*.

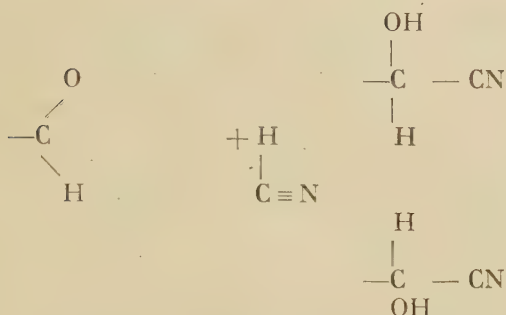
Introduction.

En vue d'étudier le métabolisme de *B. xylinum* sur quelques sucres et polyalcools en C³ et C⁷, nous avons préparé : la dioxycétone, l' α heptitol, le β heptitol, le β heptose. Nous avons préparé un sucre réducteur par action de *B. xylinum* sur le β glucoheptitol mais nous n'avons pu le faire cristalliser.

La dioxycétone a été préparée selon la méthode de G. BERTRAND modifiée par BERHAUER et SCHOEN, (1928), par action de *B. xylinum* sur le glycérol.

L' α et le β glucoheptitols ont été préparés à partir du glucose, suivant la méthode de PHILIPPE (1912) légèrement modifiée dans le cas du β glucoheptitol.

D'après la méthode de KILIANI-FISCHER l'action de l'acide cyanhydrique sur un aldose en C_n donne deux nitriles C_n + 1 par simple addition de la molécule d'acide cyanhydrique.

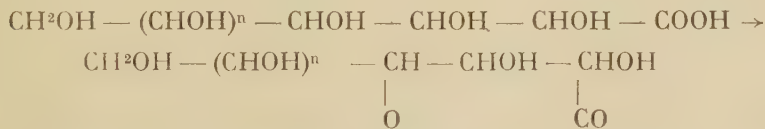


Un nouveau centre d'asymétrie est ainsi créé et l'on obtient les deux nitriles stéréoisomères en quantités très inégales.

Les deux composés α et β , dits épimères selon l'expression de VOTOCEK, sont transformés conjointement en acide et lactone, puis séparés sous cette forme. Les préparations de l' α et du β glucoheptitol se poursuivent par réduction des lactones, et, enfin par oxydation du β glucoheptitol par *B. xylinum* on obtient un sucre réducteur.

Lactones.

Les acides-alcools formés par fixation de l'acide cyanhydrique sur un aldose et hydrolyse ultérieure, sont en général peu stables, et ont grande tendance à prendre la forme lactonique :



HABERMANN observe le premier cette réaction interne en 1874.

D'après PHILIPPE (1912) le produit solide est un mélange de lactone pure et d'un peu d'anhydride d'acide, et la solution renferme la lactone, l'acide et l'anhydride d'acide en équilibre. Cette formation d'anhydride a été nettement établie pour la lactone octonique ($\alpha\alpha$) et surtout pour les lactones déconiques (α et β).

Toutes ces transformations expliquent le phénomène de mutarotation des lactones et la variation du pouvoir rotatoire par ébullition.

Aussi la connaissance du pouvoir rotatoire des lactones n'a qu'une valeur très relative : « le pouvoir rotatoire instantané dépend de la quantité plus ou moins grande d'anhydride mélangée à

la lactone ; le pouvoir rotatoire limite est fonction de la proportion d'acide formé, laquelle résulte elle-même des conditions expérimentales (temps, température, concentration) »

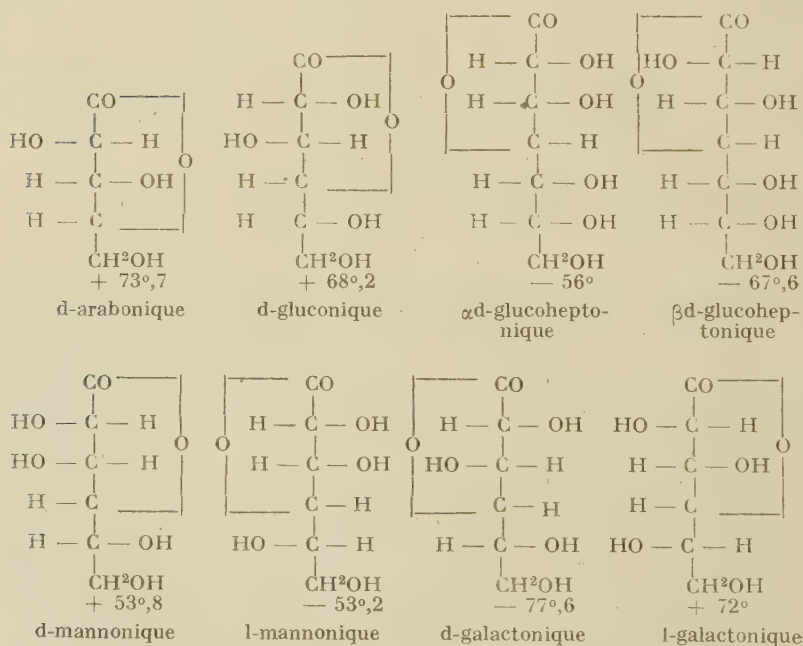
Si la valeur absolue du pouvoir rotatoire n'est pas d'une grande importance, il n'en est pas de même pour le signe de cette rotation, et HUDSON (1910) a pu déduire, d'une étude approfondie de 24 lactones, la règle suivante :

« Toute lactone, qui dans la formule écrite verticalement, présente l'oxhydrile γ [4] à droite est dextrogyre, tandis qu'elle tourne à gauche si l'oxhydrile en question se trouve à gauche de la chaîne. »

Jusqu'à présent cette règle n'a jamais été contredite pour les lactones stables. Elle est vérifiée en particulier dans le cas de la lactone β glucoheptonique.

Tableau 5

LACTONES



Voici la suite des opérations réalisées :

§ 1 — Préparation des lactones.

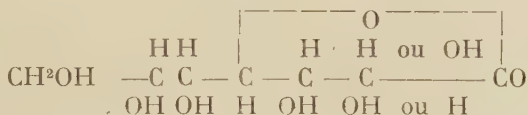
a) Préparation des nitriles.

1° Préparation du glucose.

2° Préparation de l'acide cyanhydrique.

3° Réaction de Kiliani-Fischer, et obtention des deux nitriles glucoheptoniques α et β .

puis des deux nitriles α et β glucoheptoniques, et des deux acides, lesquels ne sont pas stables et se transforment spontanément en lactones par déshydratation interne :



b) Préparation des lactones.

1° Hydrolyse des nitriles

2° Les lactones sont séparées par cristallisation de α 3° Le sirop de β lactone est purifié par transformation

a) en sel de baryum

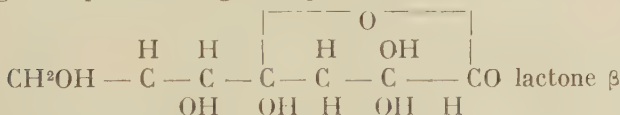
b) en sel de brucine

c) en sel de baryum

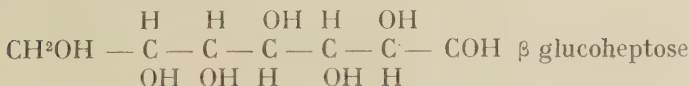
d) décomposition de ce sel en lactone et cristallisation de cette lactone.

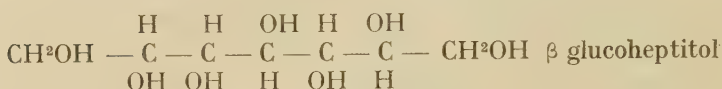
4° Propriétés de la lactone α 5° Propriétés de la lactone β .

§ 2 — Hydrogénation des lactones en heptitols.

a) Hydrogénation de la lactone α en α glucoheptitol.b) Hydrogénation de la lactone β en β glucoheptose puis du β glucoheptose en β glucoheptitol.

1° Transformation.





Cristallisation du β glucoheptitol

2^o Cristallisation du sirop de β glucoheptitol par passage par l'acétal.

3^o Essai de Cristallisation du β heptose et propriétés du β heptose.

4^o Propriétés de l'heptitol β .

§ 3 — Oxydation du β glucoheptitol par *Bacterium xylinum* :

a) Obtention d'un sucre réducteur.

b) Propriétés colorées de ce sucre.

§ 1. — Préparation des lactones α et β glucoheptoniques.

a) Préparation des nitriles.

La méthode de passage d'une ose aldéhydique ou cétonique à son homologue supérieur, utilise la réaction dite de KILIANI-FISCHER, imaginée en réalité par STHÜTZENBERGER en 1881, mais perfectionnée par ces deux savants.

Cette réaction est d'une très grande importance :

1^o Elle permet d'allonger théoriquement la chaîne des oses à l'infini (Fischer, 1890 [1], 1892, 1895 [1], E. FISCHER et PASSEMORE 1890, FISCHER et PILOTY, 1890, PHILIPPE 1912, et La FORGE 1920) mais les rendements sont de plus en plus mauvais (PHILIPPE).

2^o De déterminer avec certitude la formule d'un sucre ou d'un polyalcool de composition inconnue par comparaison à tel corps préparé synthétiquement (KILIANI, 1885, 1886, 1888). Le tableau de WOLHL et FREUDENBERG est ainsi basé sur la synthèse des sucres au moyen de la réaction des cyanhydrines (1923)

La préparation des lactones α et β glucoheptoniques a été indiquée pour la première fois d'une façon détaillée par KILIANI qui les réalisa dans le but d'établir la constitution du glucose pour lequel plusieurs formules avaient été proposées.

E. FISCHER ultérieurement, 1892, opère avec des solutions plus diluées que celles de KILIANI, pour atténuer la formation de composés d'altération semblables à des goudrons, qui noircissent la solution et entravent la cristallisation du produit final.

Dans son travail de thèse, PHILIPPE 1912, suit la méthode de

E. FISCHER à quelques détails près. BOUGAULT et PERRIER l'appliquent de nouveau en 1920. GLASER et ZUCKERMANN en 1927 insistent sur l'influence de la température. Mais, en général, tous cherchent à augmenter le rendement en lactone α , alors que nous nous sommes attachés spécialement à la lactone β , la lactone α étant toujours suffisamment abondante pour le but que nous nous proposons.

E. FISCHER applique la lettre α à celui des deux isomères qui est obtenu le premier, donc le plus facilement.

Le mode opératoire suivi par nous se rapproche beaucoup de celui de G. NITZBERG pour la lactone α glucoheptonique (1926), cependant celle-ci est facilement cristallisable, contrairement à la lactone β .

1°. — Préparation du glucose.

Le glucose utilisé est obtenu par purification du glucose massé. Le sucre impur est malaxé avec 10 à 15 % de son poids d'eau bouillante. Après refroidissement on essore le magma cristallin à la presse hydraulique. Cette opération est répétée trois fois. Une ou deux cristallisations dans l'eau suffisent ensuite pour obtenir un produit pur. A chaque opération on vérifie les pouvoirs rotatoires et réducteurs du corps obtenu, et on arrête les opérations quand les résultats sont voisins des chiffres normaux.

2° — Préparation de l'acide cyanhydrique.

L'acide est préparé par action de l'acide sulfurique sur le ferrocyanure de potassium.



selon la méthode préconisée par G. BERTRAND.

L'appareil se compose :

1° — d'un ballon de pyrex de 4 l. chauffé par un bain de paraffine maintenu à la température de 110 - 115°.

2° — d'une colonne de LEBEL et HENNIGER de 4 éléments de 4 boules chacun. Les étranglements sont bouchés par de petits tampons de toile de Cu. La colonne est munie d'un thermomètre à sa partie supérieure.

3° — d'un réfrigérant de 2 m. de longueur et dont le tube inférieur est en étain.

4° — d'un ballon de 250 cc en verre vert, préalablement éti-

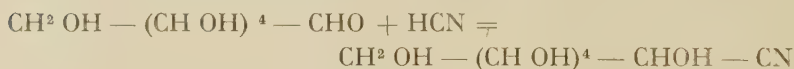
ré, afin qu'on puisse rapidement le fermer à la lampe et maintenu dans la glace pendant toute l'opération.

Toute la verrerie de l'appareil est nettoyée au mélange sulfo-chromique, à l'eau, à l'eau distillée et très soigneusement séchée.

800 grammes de ferrocyanure de potassium finement pulvérisés sont introduits dans le ballon et additionnés d'acide sulfurique à 75 % (900 gr. $\text{SO}_4 \text{H}_2$ pour 1.200 gr. d'eau) Ce mélange est préparé au dernier moment et versé encore chaud sur le ferrocyanure. Il faut boucher immédiatement avec la colonne à distiller, car le dégagement d' HCN commence presque aussitôt. Le ballon est placé dans le bain de paraffine chaud. L'acide distille à 26°. L'opération dure environ 5 heures et on recueille pour les proportions d'acide et de ferrocyanure indiquées, de 140 à 150 grammes d' HCN . Le ballon, toujours dans la glace, est fermé à la lampe aussi rapidement que possible.

3° — Réaction de KILIANI-FISCHER.

La réaction se fait suivant la formule suivante :



Théoriquement il faudrait donc utiliser 130 grammes d' HCN pour 1 kilogramme de glucose, mais il est bon de mettre un excès d' HCN et les meilleurs proportions semblent être 150 grammes d'acide pour 1 kilogramme de glucose.

Le glucose est préalablement dissous dans l'eau à raison de 1 kg dans 4 l. d'eau, et la solution est additionnée de 2 à 3 cc d' NH_3

La ballon d' HCN est refroidi dans la glace, pendant 1/2 heure au moins avant d'être ouvert, et le contenu est très rapidement versé dans la solution sucrée.

Il faut agiter afin de mélanger intimement les deux liquides, puis on abandonne à la température de 28° environ,

Le lendemain la solution brunit par suite de la formation de produits colorés, et s'assombrit de plus en plus.

Le glucose se transformant en nitrile glucoheptonique, la solution perd son pouvoir réducteur et l'on arrête l'opération quand celui-ci ne varie plus. Il est inutile de faire des dosages avant que la solution ne soit tout à fait noire, ce qui nécessite environ quatre semaines. Pour doser le sucre réducteur on fait une prise d'essai de

2 cc, on étend à 20, on ajoute quelques gouttes d' SO^4H^2 et on chauffe à l'ébullition pour chasser l' HCN en excès. Puis on poursuit le dosage de la manière habituelle. (dosage Bertrand)

Au bout d'un mois, 5 à 7 % du glucose restent encore inattaqués ; après une attente supplémentaire de 2 à 3 semaines il ne reste plus que 1 à 2 % de glucose, mais jamais le pouvoir réducteur ne disparaît complètement, il y a toujours du glucose résiduel.

b) Préparation des lactones.

1° — *Hydrolyse des nitriles.*

La solution est alors versée dans une grande marmite en fonte émaillée et on la fait bouillir à feu nu, pendant une heure, pour chasser l'excès d' HCN . Puis on ajoute 1 kg de baryte hydratée qui doit être exempte de Na. Le mieux est d'employer la baryte industrielle recristallisée une ou deux fois et préalablement dosée à l' HCl . On ajoute la baryte en deux fois, chaque fois 0 k. 500, en suspension dans 2 l. d'eau distillée.

On fait bouillir le mélange jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus d'ammoniaque, ce qui demande environ 6 heures. L'eau évaporée doit être constamment renouvelée pour éviter toute concentration de la solution ; dans le cas où celle-ci deviendrait trop épaisse, l'ébullition serait difficile, les gros bouillons en éclatant provoqueraient des projections et l' NH^3 se dégagerait plus difficilement. Pour favoriser ce dégagement il faut remuer fréquemment la solution.

L'opération terminée on verse dans une grande terrine et on neutralise par la quantité d'acide sulfurique cinq fois normal nécessaire pour précipiter exactement la baryte.

Il est bon d'ajouter l'acide sulfurique par petites portions en remuant, et, comme le précipité de sulfate de baryum ne se dépose bien qu'en présence d'un léger excès d'acide, on dépasse un peu la neutralité, quitte à y revenir à l'aide de quelques pincées de carbonate de baryum.

On laisse déposer, puis on décante la solution. Le précipité est lavé à plusieurs reprises par 4 litres d'eau bouillante jusqu'à ce que le liquide surnageant soit presque incolore. Laisser déposer et decanter. Le précipité est ensuite essoré à la trompe puis trituré avec de l'eau chaude et essoré à nouveau.

Tous les liquides sont alors réunis et concentrés sous pression réduite jusqu'à sirop épais.

On verse dans une terrine et on abandonne le tout.

2° — *Cristallisation de la lactone α .*

Quelques jours après, la lactone α commence à cristalliser et on peut l'essorer, après huit à quinze jours d'attente, soit à la presse, soit au buchner.

Les cristaux formés sont souillés de lactone β , inversement le sirop de lactone β est souillé de lactone α .

Pour le débarrasser de la plus grande partie de celle-ci, on concentre de nouveau et on abandonne à cristalliser, après avoir amorcé. La deuxième cristallisation est en général un peu moins pure que la première.

La lactone α peut être purifiée de deux façons différentes : soit par dissolutions et recristallisations successives, soit par lavages à l'alcool. Le mieux est de combiner les deux procédés : après deux ou trois malaxages avec l'alcool, une seule cristallisation suffit pour obtenir un corps presque pur.

3° — *Purification de la lactone β .*

Le procédé employé est celui que nous avons indiqué dans notre travail *Épimérisation de la lactone α en lactone β* (1932.)

Les lactones épimères sont souvent difficiles à séparer complètement et, pour purifier la lactone β , on passe par l'intermédiaire du sel de brucine. On pourrait pour cela traiter directement la lactone par la brucine (PHILIPPE), mais il est bien préférable d'employer la méthode qui est préconisée par G. BERTRAND et que nous avons déjà employée dans la séparation des glucolactones après épimérisation d' α en β (1932).

a) Lactone + BaOH $\longrightarrow$ heptonate de baryum

b) Heptonate de baryum + sulfate de brucine $\longrightarrow$ heptonate de brucine.

c) Heptonate de brucine + BaOH $\longrightarrow$ heptonate de baryum.
Purification de ce sel.

d) Heptonate de baryum + SO^4H^2 $\longrightarrow$ lactone.

a) Le sirop de lactone est délayé dans 15 parties d'eau. On dose l'acidité totale de la solution (Acidité actuelle et acidité correspon-

dant à la lactone qui se transforme en acide sous l'influence de l'addition de baryte qui rompt l'équilibre acide-lactone). On ajoute la quantité de baryte nécessaire à sa neutralisation plus un excès de 10 %. On vérifie que la solution n'est plus acide et on fait barbotter un courant de gaz carbonique qui précipite la baryte en excès sous forme de carbonate de baryum insoluble.

On fait bouillir pour décomposer la petite quantité de bicarbonate de baryum qui a pu se produire ; on filtre à chaud. On obtient ainsi une solution limpide d'heptonate de baryum que l'on transforme en heptonate de brucine par double décomposition avec du sulfate de brucine.

b) Le sulfate de brucine est préparé à partir de la brucine du commerce, dont on dissout 266 gr. dans 4 litres d'eau bouillante, acidulée par 40 cc d'acide sulfurique. La solution chaude est filtrée et par refroidissement donne de magnifiques cristaux de sulfate de brucine cristallisés que l'on essore et lave.

Il est nécessaire d'opérer en solution diluée pour obtenir une séparation facile du SO_4Ba et de l'heptonate de brucine.

A la solution d'heptonate de baryum on ajoute peu à peu la solution chaude de sulfate de brucine. Dès la transformation complète de l'heptonate de baryum en sel de brucine, le sulfate de baryum formé, jusque là en suspension dans le liquide, tombe lentement au fond du vase, ce qui dénote la fin de la réaction. Après un repos d'une nuit, le précipité essoré est lavé plusieurs fois, tous les liquides sont réunis et concentrés, mais sans atteindre la consistance sirupeuse : l'heptonate de brucine ne cristallise bien qu'en présence d'eau ce qui implique l'existence d'une ou plusieurs molécules d'eau dans sa formule, ainsi que la plupart des sels de brucine.

Aussi la solution versée encore bien liquide dans une terrine, cristallise rapidement et peut déjà être essorée le lendemain. Après deux ou trois lavages, le sel est généralement très blanc. Les eaux de lavage concentrées, fournissent une cristallisation moins satisfaisante ; quant aux cristaux de troisième jet ils sont très souillés d'heptonate de brucine α .

c) La transformation de l'heptonate de brucine en heptonate de baryum s'effectue par addition de baryte hydratée.

100 gr. d'heptonate de brucine dissous dans 600 gr. d'eau chaude sont décomposés par 30 gr. de baryte en solution dans 600 cc d'eau

On chauffe au bain-marie, pendant une dizaine de minutes, pour rassembler la brucine qui surnage. Après complet refroidissement on essore, et, dans le liquide filtré une nouvelle portion de 100 gr. est dissoute, puis précipitée comme précédemment par 30 gr. de baryte.

La brucine est essorée le lendemain. On s'assure que tout l'heptonate de brucine est décomposé en vérifiant que la solution ne précipite plus la baryte, et d'autre part, on se débarrasse de l'excès de baryte qui a pu être introduit en suivant la méthode déjà utilisée.

(Jusqu'à présent l'heptonate de baryum n'avait pu être obtenu cristallisé, mais nous avons été heureuse de voir après de longs essais, nos efforts couronnés de succès.)

Pour purifier la solution d'heptonate de baryum encore souillée de traces de brucine, nous avons utilisé la grande solubilité de cette alcaloïde dans le chloroforme.

Le liquide, concentré à un volume de 350 cc, est versé dans une allonge à robinet. On ajoute 400 cc de chloroforme et on agite doucement pour ne pas faire émulsion. On décante le solvant, on le filtre et le distille, jusqu'à ce qu'on obtienne un résidu de quelques centimètres cubes, que l'on évapore à sec, pour peser la brucine dissoute. Après sept épuisements il ne reste plus d'alcaloïde; la quantité totale extraite n'a jamais atteint 5 gr. Le même chloroforme est utilisé pour toute la série des opérations.

d) La solution pure d'heptonate de baryum est alors traitée par la quantité d'acide sulfurique (cinq fois normale) nécessaire pour transformer le sel en lactone. L'acide est versé par petites portions : au moment où la réaction se termine le précipité de sulfate de baryum tombe au fond du vase. On décante, on essore, on lave le précipité et tous les liquides réunis, concentrés dans le vide à sirop clair, sont abandonnés à cristalliser dans une petite capsule de verre; quelques jours après le tout est une masse compacte. On broie les cristaux avec un peu d'alcool, on les essore, on les lave et on abandonne à dessécher dans le vide.

200 gr. d'heptonate de brucine nous ont donné 65 gr. de β lactone cristallisée. Or 200 gr. d'heptonate de brucine correspondent à 67 gr. de lactone, nous avons donc un rendement de 97 %.

La quantité de β lactone obtenue étant insuffisante nous en avons préparée par épimérisation de lactone α . (1932).

4° — *Propriétés de la lactone α glucoheptonique.*

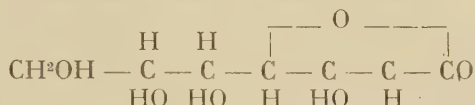
La lactone α cristallise facilement en beaux cristaux.

Point de fusion. G. NITZBERG donne comme point de fusion au bloc Maquenne 156-157°, nous avons obtenu 156°.

Solubilité. Elle est très soluble dans l'eau : 100 cc d'une solution saturée à 25°, renferment 43 g. de lactone. La lactone α se dissout assez bien dans l'alcool chaud.

Pouvoir rotatoire. Le pouvoir rotatoire est lévogyre conformément à la règle de HUDSON.

Après 10 minutes de dissolution le pouvoir rotatoire spécifique est de -51° , 7, après 6 heures il tombe à -48° pour s'y stabiliser.

5° — *Propriétés de la lactone glucoheptonique β .*

La lactone β cristallise en très fines aiguilles anhydres.

Point de fusion. — PHILIPPE donne comme point de fusion au bloc MAQUENNE 161° - 162°, nous avons obtenu les mêmes chiffres.

Solubilité. Elle est très soluble dans l'eau : 100 cc d'une solution saturée à 25° renferment 58 g. 9 de lactone. La lactone β se dissout assez bien dans l'alcool chaud, 100 cc d'alcool à 90° bouillant en dissolvent 20 grs.

Pouvoir rotatoire. — Le pouvoir rotatoire est lévogyre conformément à la règle de HUDSON.

Après 3 minutes de dissolution une solution à 10 % a un pouvoir rotatoire de -82° , 1.

Après 6 heures il tombe à -68° , 2 pour se stabiliser aux environs de -68° (-67° , 9 PHILLIPE, -67° , 6 HUDSON)

Nous avons vu quelles conclusions sur l'équilibre lactone, acide, anhydride d'acide, PHILIPPE tire de ces variations du pouvoir rotatoire.

§ 2. — Hydrogénation des lactones glucoheptoniques en glucoheptitols.

Nous avons vu que les lactones glucoheptoniques étaient en quelque sorte la forme stable des acides correspondants. Par

réduction le groupe carboxyl des acides additionne deux atomes d'hydrogène et se transforme en fonction aldéhyde. La réduction se fait par l'amalgame de sodium (FISCHER, 1889, [2] [6] 1890) en solution faiblement acide ; si la solution s'alcalinise il se produit des isomérisations internes (FISCHER, [4] 1890).

L'aldose obtenue est réduite en polyalcool ; cette seconde hydrogénation peut se faire en milieu légèrement alcalin.

a) Hydrogénation de la lactone glucoheptonique α en glucoheptitol α .

Nous avons utilisé la même méthode que G. NITZBERG pour transformer la lactone α en heptitol α .

Les propriétés du glucoheptitol α sont celles qu'indique G. NITZBERG.

b) Hydrogénation de lactone glucoheptonique β en glucoheptitol β .

1° Transformation et cristallisation.

La réduction de lactone en heptitol se fait par l'amalgame de Na à 2,5 % en solution nettement acide au début de la réaction et qu'on laisse s'alcaliniser légèrement vers la fin.

L'amalgame est préparé avec un soin particulier, il est en effet nécessaire d'éviter toute trace de métal étranger, la moindre impureté ayant l'effet le plus néfaste sur la marche de la réaction.

Le Hg est lavé successivement à l'eau, à l'acide sulfurique, à l'eau, à l'acide nitrique dilué, à l'eau, à l'alcool, filtré entre chaque lavage sur un entonnoir à douille capillaire et finalement distillé dans le vide dans l'appareil de Gorey. (Nous devons cependant noter, que nous avons utilisé dans la suite des opérations, une baguette de fer et un couteau d'acier. Nous ne croyons pas que cela nuise à l'activité de l'amalgame.) On peut utiliser avec intérêt, le procédé de purification indiqué par J. CORBIÈRE.

On pèse 4875 gr. du mercure ainsi purifié dans un creuset de terre réfractaire et on chauffe en remuant jusqu'à 50 - 60°. Il ne faut pas que la température soit, ni inférieure à 50°, car la combinaison ne se ferait pas facilement, ni supérieure à 60°, car il y aurait alors des projections d'amalgame au moment de la déflagration produite par l'introduction du sodium.

125 gr. de Na soigneusement débarrassés de toutes parties oxydées, et découpés en cubes de 2 cm d'arête, sont conservés dans du

pétrole jusqu'au dernier moment, puis séchés sur du papier filtre.

On laisse tomber rapidement un morceau dans le creuset, on recouvre et on remue vigoureusement à l'aide d'une forte baguette de fer après avoir entendu crépiter le sodium.

L'opération provoquant un dégagement de vapeurs nocives, il faut prendre la précaution de travailler sous une hotte à fort tirage.

Une fois les 125 gr. introduits, on laisse refroidir jusqu'à cessation du bouillonnement. Puis on verse dans une grande cuvette à photographie, on couvre et on attend que l'amalgame prenne l'état pâteux. On coupe alors avec un couteau d'acier et on laisse solidifier. Les morceaux d'amalgame de sodium sont conservés dans un flacon de verre à large ouverture.

On prépare aussi une solution d'acide sulfurique à 350 gr. par litre, destinée à neutraliser la soude formée par la décomposition de l'amalgame, et on détermine la correspondance de la solution acide à l'amalgame utilisé. Soit n cc pour 50 gr. d'amalgame.

Il est bon d'opérer la réduction en solution aussi concentrée que possible; d'autre part la réaction doit se faire aux environs de 0° pour éviter des transpositions moléculaires; aussi, tenant compte de la solubilité de la lactone, 40 % à 20° , nous avons travaillé sur une solution à 20 %.

10 gr. de lactone sont dissous dans 50 cc d'eau dans un flacon d'un litre à large ouverture. Afin d'éviter toute perte de matière due à l'entraînement par l'hydrogène dégagé, un tube à boule traverse le bouchon obturant le flacon.

Le tout est placé dans un mélange réfrigérant de glace et de sel et on attend que la solidification se fasse avant de commencer l'opération.

On acidifie par $2n$ cc d'acide puis on ajoute 50 gr d'amalgame pulvérisé et on agite vigoureusement pour activer la décomposition de ce dernier.

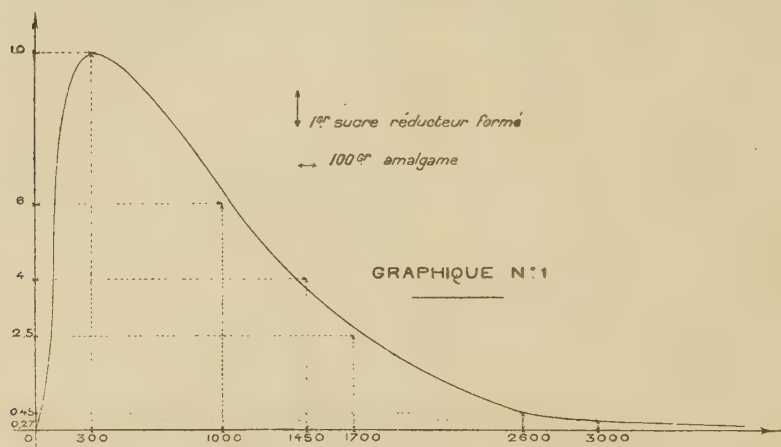
Quand elle est terminée on introduit de nouveau n cc d'acide puis 50 gr. d'amalgame et ainsi de suite.

Nous avons étudié soigneusement la marche de l'opération en faisant des dosages de sucre réducteur.

Comme nous ne recherchions pas un chiffre exact, mais un ordre

de grandeur et qu'il y avait intérêt à opérer rapidement, voici la méthode de dosage employée :

On porte à l'ébullition 1 cc de liqueur cupro-alcaline et on ajoute la solution sucrée goutte à goutte en faisant bien bouillir :



(les sucres en C⁷ réduisent moins facilement que les sucres en C⁶ et de plus le sulfate de sodium présent gêne encore la réduction.)

Nous avons résumé cette étude dans le graphique ci-dessus.

Le pouvoir réducteur de la solution, d'abord nul, croît rapidement et est en général maximum après addition de 300 gr. d'amalgame. Presque toute la lactone est alors transformée en heptose. Mais on n'a pas intérêt à isoler celui-ci car il est incristallisable, et il vaut mieux poursuivre directement la transformation d'heptose en heptitol. En général, cette dernière opération est virtuellement terminée après addition de 2 à 3 kg d'amalgame.

En fait il y a un peu d'heptose résiduel et il est impossible d'arriver à une transformation parfaite (1).

Le mercure est décanté et lavé à l'acide sulfurique dilué, puis à l'eau.

(1) Pour faciliter l'agitation on peut décanter le Hg au cours de l'opération.

Ne jamais interrompre le travail avant que la transformation d'heptose en heptitol soit bien avancée.

Ne jamais abandonner en milieu alcalin ou neutre, mais très nettement acide.

L'agitation peut être faite à la machine, il y a cependant intérêt à opérer à la main jusqu'à la possession parfaite de la marche de l'hydrogénation.

Le sulfate de sodium, essoré, est lavé à l'alcool à 60° chaud. S'il contient encore du sucre réducteur, on le dissout dans la plus petite quantité d'eau possible et on le précipite de nouveau par l'alcool.

Tous les liquides réunis sont partiellement concentrés, puis neutralisés exactement à la soude et additionnés d'alcool fort, afin d'obtenir un mélange alcoolique de titre 60° favorable à la précipitation du sulfate de sodium. On agite vigoureusement et on laisse déposer le sel qui précipite. Le lendemain, après essorage, on lave le sel à l'alcool à 60° et on concentre à sirop clair.

Ce sirop d'heptitol versé dans une capsule cristallise rapidement. On essore et on lave les cristaux comme d'habitude et on conserve les eaux de lavage concentrées à l'état sirupeux.

Le sucre ainsi obtenu est encore un peu souillé de sulfate de sodium. Pour se débarrasser de celui-ci, on fait bouillir 20 gr. avec 200 cc d'alcool à 80°, au réfrigérant ascendant, pendant une demi-heure. Après décantation et filtration, on verse la liqueur alcoolique dans le ballon et on fait une nouvelle digestion. Trois opérations suffisent à entraîner tout le sucre.

On a maintenant des cristaux purs qu'on essore et un liquide saturé de sucre, contenant, non seulement de l'heptitol, mais de l'heptose qu'il est assez délicat de séparer.

Nous nous sommes basée sur la propriété du premier de donner un acétal cristallisé avec l'aldéhyde benzoïque alors que le second en est incapable.

2° — *Cristallisation du sirop de β glucoheptitol par passage par l'acétal.*

C'est une règle générale que les alcools de sucre se condensent avec la benzaldéhyde en donnant des acétals bien cristallisés (FISCHER, 1894, 1896, MEUNIER, 1891). Les alcools sont facilement régénérés à partir des acétals par hydrolyse à l'aide des acides dilués.

A 100 gr. de sirop de β heptitol très épais on ajoute 60 cc d'acide sulfurique à 50 % en volume, en délayant soigneusement afin d'avoir une solution parfaitement homogène. Le tout est introduit dans un flacon de 500 cc à large ouverture et additionné de 50 gr d'aldéhyde benzoïque. Le flacon, soigneusement bouché est agité vigoureusement pendant 15 minutes environ (Plus le sirop est

impur, plus longue doit être la durée d'agitation). La réaction se dévoile par un dégagement exothermique, puis peu à peu, on voit le liquide s'épaissir, s'empâter, couler avec de plus en plus de difficultés le long des parois du flacon, former de petits grumeaux, puis cristalliser. Par repos le tout prend en masse.

Le lendemain l'acétal est extrait du flacon et soigneusement broyé. Quand la pâte est homogène, on la délaye avec environ 300 cc d'eau. La pâte, bien fluide, est rapidement versée sur un buchner et essorée. On lave ainsi trois ou quatre fois et, si le chlorure de baryum décèle encore la présence d'acide sulfurique dans le liquide d'essorage, on fait deux lavages à l'alcool à 60°. — Toutes les eaux de lavage sont mises de côté et traitées séparément —.

L'aldéhyde benzoïque donne trois acétals avec l'heptitol chaque acétal existe sous deux formes, et l'alcool fait gonfler considérablement la forme gélatineuse, ce dont il faut se méfier en essorant.

L'acétal (280 gr.) est introduit dans un ballon d'un litre, additionné de 100 cc d'alcool à 95°, 10 cc d'acide sulfurique au 1/2 et 50 gr d'aldéhyde benzoïque. Le ballon est adapté sur un appareil à entraînement par la vapeur d'eau. L'acide dilué décompose l'acétal et l'heptitol demeure dans la solution sulfurique, avec des traces d'acide benzoïque, cependant que l'alcool et l'aldéhyde benzoïque sont entraînés.

Pour se débarrasser de l'impureté on épuise par l'éther qui dissout très facilement l'acide benzoïque. Quatre traitements de 250 cc dans une ampoule à décantation suffisent mais il faut agiter très lentement, car la solution a grande tendance à s'émulsionner.

La solution sulfurique de sucre est neutralisée à la craie qui précipite l'acide sulfurique. Le précipité de sulfate de calcium est soigneusement lavé et broyé trois fois, les eaux de lavage sont alors parfaitement claires; tous les liquides réunis sont concentrés à un volume de 100 cc.

A cette solution sucrée on ajoute un volume égal d'alcool à 95°, on agite soigneusement et vigoureusement et on laisse déposer le faible précipité de sulfate de calcium qu'on essore le lendemain. Puis ce précipité est lavé deux fois avec de l'alcool à 50 %. On concentre à sirop le liquide filtré et les eaux de lavage.

Aux 40 gr. de sirop ainsi obtenus on ajoute 30 cc d'eau et 200 cc

d'alcool fort, on fait bouillir 30 minutes avec un réfrigérant ascendant, et on filtre chaud le liquide clair dans un autre ballon, où se produit une belle cristallisation. Le lendemain on décante le liquide sur le sirop, et on fait trois traitements identiques.

Les cristaux sont extraits du ballon, broyés avec de l'alcool à 85° puis essorés et mis à sécher dans le vide.

Les eaux d'essorage et de lavage sont concentrées au quart de leur volume et additionnées peu à peu d'alcool à 95° jusqu'à l'apparition d'un trouble.

Le liquide abandonné deux jours a laissé déposer des gouttelettes de sirop. On a décanté dans un autre ballon et amorcé par un germe d'heptitol. La cristallisation avait commencé dès le lendemain et s'est accrue à chaque addition de 5 cc d'alcool à 95°, par 24 heures jusqu'à concurrence de 50 cc.

Les eaux d'essorage et de lavage de l'acétal sont partiellement concentrées et traitées à l'éther pour les débarrasser de l'acide benzoïque qu'elles peuvent contenir, puis neutralisées au carbonate de calcium. Les eaux d'essorage et de lavage du précipité de sulfate de calcium sont concentrées jusqu'à sirop (50 gr), et quatre traitements avec 300 cc d'alcool à 85° sont nécessaires pour extraire le sucre. Les solutions alcooliques réunies sont concentrées à l'état de sirop et transformées en acétal comme précédemment et ainsi de suite jusqu'à épuisement de l'heptitol.

Les résidus renferment alors très peu d'heptose que la suite des opérations précédentes a presque entièrement détruit, et de l'heptonate de sodium. Pour récupérer celui-ci, on dose l'alcalinité des cendres, on neutralise à l'acide sulfurique et on précipite le sulfate de sodium par l'alcool.

Les points de fusion de l'heptitol bien cristallisé de premier jet et de l'heptitol après acétal sont identiques, de même que les pouvoirs rotatoires.

3° — *Essai de cristallisation du β glucoheptose et propriétés.*

Le sirop est versé dans un ballon, on ajoute 250 cc d'alcool à 95° et on fait bouillir avec un réfrigérant ascendant pendant 1 1/2 heure. On laisse reposer 24 heures dans le ballon, puis on décante dans un matras.

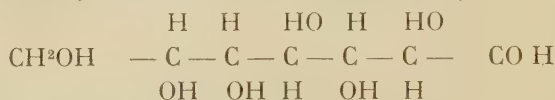
On renouvelle cette opération avec de l'alcool à 95°. Puis

5 fois avec de l'alcool à 85° (on dilue le sirop dans la quantité calculée d'eau et on ajoute de l'alcool à 95°).

Les matras 8 et 9 proviennent d'épuisements identiques effectués avec de l'alcool à 73°.

Les neuf matras laissés au souterrain pendant un mois n'ont pas cristallisé.

On a ajouté alors 50 cc d'acétone pour 250 cc. de liquide dans chaque matras, mais rien n'a cristallisé.



Le β glucoheptose est un sirop faiblement lévogyre.

Son pouvoir réducteur est environ 60 % de celui du glucose. Il est infermentescible.

4° Propriétés du β glucoheptitol.

Préparé pour la 1^{re} fois par PHILIPPE, le glucoheptitol cristallise en petites tablettes rectangulaires, pouvant aisément former des amas étoilés assez gros. Ces cristaux sont durs et nullement hygroscopiques.

Point de fusion. — L'heptitol fond à 128°-129°. PHILIPPE donne les chiffres de 130° - 131° et WHERRY 128° - 129°.

Solubilité. — La solubilité dans l'eau froide est de 50 % environ elle augmente beaucoup avec la température. La matière dissoute en excès cristallise immédiatement par refroidissement.

Elle est presque insoluble dans l'alcool froid et très peu dans l'alcool absolu bouillant (2 % environ).

Pouvoir rotatoire. — Le β glucoheptitol est, contrairement à son isomère α , actif sur la lumière polarisée.

La solution à 5 pour 100 dans un tube de 50 cm donne une rotation de $\alpha = + 11'$ pour $\theta = 10^\circ$ donc

$$[\alpha_D] 10^\circ = 44'$$

Par addition de borax, 5 % de borax dans une solution à 10 %, la solution de β glucoheptitol devient lévogyre $\alpha = - 50'$

Constitution. — La constitution résulte de sa préparation ainsi que de l'inactivité par symétrie interne de son isomère l' α glucoheptitol.

Dérivés du β glucoheptitol. — PHILIPPE a préparé l'ester hep-

tacétique et l'ester heptabenzoiïque, l'acétal tribenzoïque et l'acétal formique.

Nous avons déjà exposé la méthode que nous avons utilisé pour préparer l'acétal benzoïque.

Comme nous l'avons dit, Gabriel BERTRAND (thèse) a montré qu'on obtient des mélanges d'acétal, mélanges de composition variable suivant les conditions expérimentales. Il est donc vain d'essayer de déterminer les constantes des combinaisons benzaldéhydiques.

Poids moléculaire de l'heptitol β

Nous avons utilisé la cryoscopie pour vérifier le poids moléculaire de l'heptitol, nous avons toujours obtenu un chiffre inférieur à celui de 210 exigé par la théorie, mais l'écart est faible et de l'ordre de grandeur des écarts déjà constatés dans la détermination des poids moléculaires de maints polyalcools (MAQUENNE, G. NITZBERG).

Expérience N°	I	II	III	IV
Point de congélation de l'eau bidistillée employée à la dissolution de l'heptitol	— 0,395	— 0,38	— 0,38	— 0,38
Point de congélation de la solution d'heptitol	— 0,22	— 0,22	— 0,22	— 0,22
Abaissement du point de congélation	0,175	0,16	0,16	0,16

Le premier donne le résultat de 187 mais les trois autres, parfaitement identiques, donnent 204.

§ 3. — Oxydation du β glucoheptitol par *B. xylinum*.

a) — Obtention d'un sucre cétonique.

D'après la règle de G. BERTRAND, *B. xylinum* doit oxyder le β glucoheptitol.

La fonction alcool secondaire attaquée doit se transformer en fonction cétone. On passera ainsi d'un sucre non réducteur à un sucre réducteur. Pour vérifier l'exactitude de l'hypothèse il suffit d'utiliser le β glucoheptitol comme substance nutritive d'un bouillon de levure et, après croissance, de vérifier la réaction de ce bouillon vis-à-vis de la liqueur de Fehling.

A partir d'une jeune souche très oxydante nous ensemençons un petit matras à culture de 50 cc contenant 150 mg d'heptitol dissous dans 5 cc de bouillon de levure à 5 ‰ d'extrait sec.

Placée dans une étuve à 28° (température optimum pour *B. xylinum*) la culture part très rapidement et 13 jours plus tard on décèle la présence d'une grande quantité de sucre réducteur : la bactérie du sorbose oxyde bien le β glucoheptitol.

Il nous reste maintenant à préparer le nouveau sucre en quantité suffisante pour l'étudier. Il faut déterminer tout d'abord la concentration d'heptitol optimum et la durée d'oxydation la plus favorable.

On ensemence préalablement un pied de cuve : 5 cc de bouillon de levure, plus 150 mg. d'heptitol. La culture est « partie » en quelques jours, et, à partir de cette jeune et active souche, nous avons ensemencé, à raison de 1/10 cc par matras, 12 petits matras à culture à fond très large et contenant :

Les matras 1,2,3, une solution d'heptitol à 1 ‰			
— 4,5,6,	—	—	2 —
— 7,8,9,	—	—	3 —
— 10,11,12	—	—	4 —

Après 13 jours, on arrête l'oxydation des matras : 1,4 7 et 9 et on dose le sucre réducteur formé de la façon suivante : on donne 3 bouillons à la culture et décante le liquide dans une fiole conique tarée ; on lave à l'eau chaude la zoogléa dans le matras et on décante les eaux de lavage jusqu'à concurrence d'un poids total de 20 grammes. On opère alors un dosage de sucre par la méthode de Bertrand.

Nous avons déterminé le sucre réducteur formé en glucose et nous l'avons évalué en nous basant sur le fait que le pouvoir réducteur des sucres en C⁷ est en général 88 % de celui du glucose.

Après 23 jours on dose de même le sucre réducteur dans les matras 2,5,8 et 11 et après quarante-quatre jours d'oxydation dans les derniers matras.

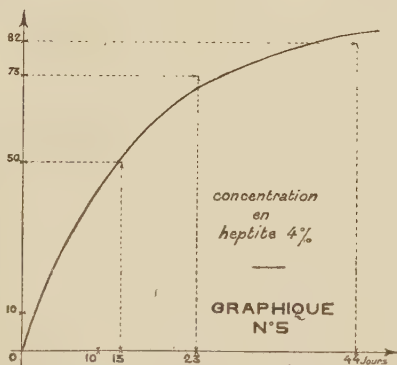
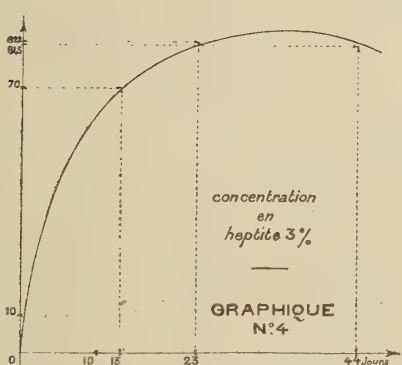
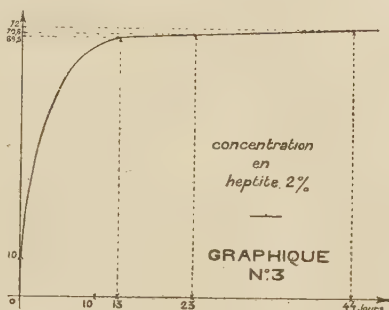
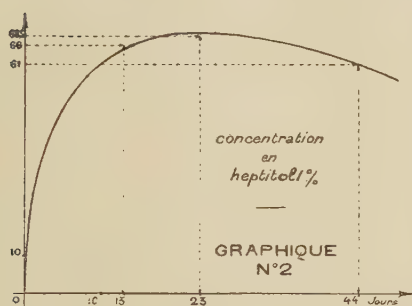
Les résultats de cette étude sont exposés dans les graphiques pages 59 et 60.

On voit que les concentrations les plus favorables sont celles de 3 et 4 ‰ et que la durée d'oxydation ne doit pas dépasser un certain temps, variable avec la concentration en sucre.

En effet la bactérie, après avoir oxydé l'heptitol s'attaque à la

cétose produite par cette oxydation, la transforme en gaz carbonique, eau et des corps indéterminés.

Nous basant sur ces résultats nous avonsensemencé 14 matras de deux litres contenant chacun 70 cc d'un bouillon d'heptitol à 3% soit 2,10 g. par matras; 30 mg. par centimètre cube.



Graphiques exprimant le sucre réducteur formé par croissance de *Bacterium xylinum* sur le β glucoheptitol (1) en fonction du temps, aux concentrations 1, 2, 3, et 4 ‰.

Voici les résultats :

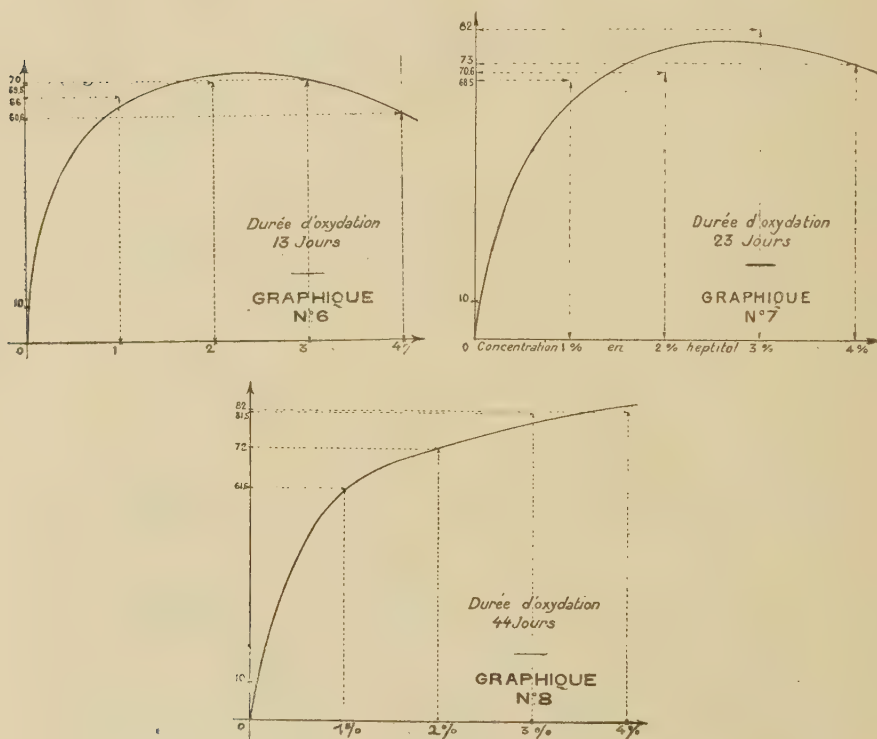
Concentration	3 ‰
Volume de solution par matras [.....	70 cc ³
Durée moyenne d'action	21 jours
Rendement moyen	44 ‰

De plus, nous avonsensemencé les quatorze matras par des quantités différentes de pied de cuve variant de 1/20 de centimètre

(1) « ol » est la nouvelle terminaison des alcools, les heptites-alcools sont donc devenus des heptitols.

cube à 1 centimètre cube; dans l'un d'eux nous avons même introduit une zoogée déjà formée, et nous avons pu voir que plus est faible la quantité de germe introduite, mieux la culture marche plus vite et plus complètement.

Comme on le voit dans le tableau 6 nous avons obtenu ainsi: de 25 à 100 % de sucre réduit et un chiffre dérisoire: 15 % pour le



Graphiques exprimant le sucre réducteur formé par croissance de *Bacterium xylinum* sur le β glucoheptitol en fonction de la concentration, après 13, 23 et 44 jours.

matras ensemencé par un fragment de zoogée. Nous avons ensemencé également dix matras identiques contenant 140 cc soit une hauteur deux fois plus grande de liquide; dans ces conditions les rendements ont été très mauvais: la couche de liquide était trop épaisse pour permettre une bonne oxydation de l'heptitol. (1^{re} série).

Tableau 6.

Quantité de fond de cuve employée pour l'ensemencement	Durée d'oxydation	Quantité de sucre réducteur formé
1/20 de cc.	24 jours	99 %
1/20 —	22 —	77 —
1/20 —	15 —	77 —
1/10 —	27 —	71 —
1/10 —	22 —	65 —
1/10 —	28 —	57 —
1/5 —	24 —	42 —
1/5 —	20 —	39 —
1/5 —	23 —	32 —
1/2 —	27 —	30 —
1/2 —	15 —	30 —
1/2 —	15 —	25 —
—	20 —	20 —
zooglée	20 —	15 —

Extraction de l'heptitol. — Dans chaque matras la solution est additionnée de 250 cc d'alcool à 90° et on fait bouillir le tout. Ceci a pour but de permettre une séparation plus aisée de la zooglée.

On filtre sur buchner (sans papier). On fait bouillir la zooglée plusieurs fois avec de l'eau distillée et toutes les eaux de lavage sont réunies.

La solution est distillée dans le vide pour chasser l'alcool, puis déféquée par l'acétate de plomb (nous avons préparé nous-mêmes l'acétate de plomb utilisé.) On filtre sur buchner, le précipité est soigneusement lavé, et on précipite l'excès d'acétate de plomb dans la solution par l'hydrogène sulfuré.

On concentre le liquide jusqu'à sirop clair, on verse dans une capsule tarée et on poursuit l'évaporation dans le vide sulfurique.

La solution cristallise très facilement, mais les cristaux qu'on obtient ainsi sont uniquement des cristaux d'heptitol.

Dans la première série de cultures nous avons ainsi récupéré seulement 10 gr. sur 60 gr. d'heptitol introduit et 20 gr. de sirop soit 50 % ont disparu, corroborant ainsi nos prévisions d'oxydation imparfaite. Dans la deuxième série 20 % seulement ont disparu.

Les eaux de lavage d'heptitol sont jointes au sirop d'essorage et sur 0 gr. 2 on fait un dosage d'alcalinité des cendres avec une so-

lution de $\text{SO}^4\text{H}^2 \text{ N} / 1.000$. Nous savons ainsi quelle quantité de sucre se trouve à l'état de combinaison et on détruit celle-ci par la quantité exactement nécessaire d'acide sulfurique.

La solution concentrée, on précipite le sulfate de potassium par l'alcool. Le sel essoré est lavé et toutes les solutions (d'essorage et de lavage) réunies, sont concentrées à l'état de sirop clair que l'on abandonne à cristalliser. Mais on obtient encore cette fois uniquement des cristaux d'heptitol. Après séparation complète des derniers résidus d'heptitol, nous nous sommes efforcés de réaliser la cristallisation du sirop de sucre réducteur.

Nous avons utilisé de nombreux solvants, en particulier l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, l'acide acétique, le cyclohexanol, la cyclohexanone, mais sans aboutir à aucun résultat ; même en opérant à basse température. Nous nous sommes efforcée aussi d'obtenir la cristallisation du sirop en utilisant diverses amorces, mais là aussi nos essais furent vains.

b) Réactions colorées du sucre réducteur, du β glucoheptitol et du β glucoheptose.

Le sucre réducteur obtenu n'étant pas parfaitement pur, le sirop de ce sucre est un peu coloré en brun et, pour effectuer les réactions colorées, nous avons dû utiliser un moyen détourné :

Nous avons employé du β glucoheptitol récupéré des cultures de *Bacterium xylinum* et bien cristallisé, mais encore imprégné de sucre réducteur.

De crainte que l'heptitol ne masque les réactions de l'heptulose, nous avons effectué comparativement toutes les réactions colorées avec de l'heptitol pur.

Afin que ces réactions soient comparables entre elles, toutes ont été faites en ajoutant à 0,5 cc d'une solution aqueuse contenant 1 % de sucre (heptose, heptitol, sucre réducteur) 2 cc d'acide chlorhydrique concentré dans les essais I, IV, V, VI, 2 cc d'acide chlorhydrique concentré + 2 cc d'eau dans les essais II et III et 0,1 ou 0,2 cc d'une solution aqueuse ou alcoolique de réactif (sauf les essais I et II faits avec les réactifs cristallisés).

Nous attirons l'attention sur le fait que la réaction de Seliwanoff des *sucres céloniques* est positive dans le cas du sucre réducteur.

RÉACTIONS COLORÉES DU SUCRE RÉDUCTEUR,
DU β GLUCOHEPTITOL ET DU β GLUCOHEPTOSE

β <i>glucoheptose</i> .	β <i>glucoheptitol</i>	<i>Sucre réducteur</i>
-------------------------------	------------------------------	------------------------

I. — ORCINE (QUELQUES CRISTAUX) A FEU NU

après 1 à 2 minutes

Solution rose, rose violet puis précipité bleu.	Solution rose très pâle.	Solution rose violet puis précipité bleu
---	--------------------------	--

après 24 heures

Solution surnageante <i>violette</i> .	Solution rose très pâle.	Solution surnageante <i>jaune rouge</i> .
--	--------------------------	---

II. RÉSORCINE (QUELQUES CRISTAUX) A FEU NU

Réaction de Séliwanoff

après 1 à 2 minutes

Rose, rouge sang, jaune.	Incolore.	Rose, rouge cerise, rouge brun, <i>précipité</i> formé rapidement et brun foncé, <i>réaction positive</i> .
--------------------------	-----------	---

III. — RÉSORCINE (0,2 sol. alcool au B. M.)

après 1 à 2 minutes

Rose puis violet.	Mauve. on laisse refroidir	Jaune vert.
Rose violet, léger précipité.	Mauve.	Jaune vert, précipité.

IV. — PHLOROGLUCINE (0,1 alcool au B. M.)

Après 1 à 2 minutes

Solution rose, orangée, précipité noir abondant.	Jaune clair.	Jaune clair. Jaune orangé, brun, pas de précipité.
--	--------------	--

V. — PHLOROGLUCINE (0,2 sol. alcool à froid)

Après quelques secondes

Jaune clair.		
Jaune brun.	Après 24 heures	

CHAPITRE IV

MÉTABOLISME DE *BACTERIUM XYLINUM*

- § 1. Introduction.
- § 2. Technique et erreurs des mesures. Préparation des zoogléas, détermination des poids secs.
- § 3. Conditions optima d'expérimentation.
pH — tampon — concentration — âge de la zooglée — quantité de zoogléas.
- § 4. Alcools.
- § 5. Polyalcools.
- § 6. Esters et éthers de polyalcools.
- § 7. Oses, osides.

§ 1. — Introduction.

La quantité de O² consommée en fonction de l'aliment et du milieu par les bactéries acétiques a été étudiée par H. QUÉRÉ (*B. Bordeaux*) et A. REID (*B. pasteurianum*) la même année, 1931, par WIELAND et BERTHO de 1928 à 1931, par TAMIYA et TANAKA en 1930 et TANAKA, 1931 (*B. pasteurianum*).

Les bactéries cétogènes n'ont pas encore été étudiées, *B. xylinum* grâce à ses propriétés parfaitement déterminées est un sujet de choix. Deux problèmes se posent :

1° — Quelles sont les molécules que la bactérie est capable d'oxyder ?

2° — Les molécules assimilables comme aliment de croissance par la bactérie sont-elles identiques aux molécules qu'elle peut oxyder ?

L'expérience montre que la bactérie oxyde les molécules qui lui servent d'aliment de croissance et celles-là seulement.

Les alcools et les sucres étudiés au point de vue de leur oxydabilité par *B. xylinum*, se divisent nettement en trois groupes :

1° — Les corps où la vitesse de consommation d'oxygène est plus grande que sur milieu minéral ; (2 à 3 fois plus grande) et se maintient pendant plusieurs heures à ce niveau constant. Ces corps sont identiques à ceux qui permettent la croissance de la bactérie dans la mesure où ceux-ci ont été étudiés.

2° — Les corps où la vitesse de consommation d'oxygène est la même que sur le milieu minéral. Certains de ces corps donnent, au moment où on les ajoute à la suspension bactérienne, un « coup de fouet » à la vitesse de la respiration ; mais cette excitation ne se prolonge pas au-delà de quelques quarts d'heure (alcool méthylique, éthylglycol).

3° — Les corps où la vitesse est plus faible que sur milieu minéral : il y a effet narcotique, inhibition de la respiration. C'est le cas des alcools supérieurs, butylique et amylique, des monoforamine et monochlorhydrine du glycol, c'est le cas des esters de l'acide bromacétique.

§ 2. — Technique et erreurs des mesures.

Préparation des zooglées. Détermination des poids secs.

a) Technique des mesures.

La respiration de *B. xylinum* est mesurée au moyen de la méthode manométrique de O. WARBURG.

Cette méthode a déjà été décrite maintes fois en détail (O. WARBURG, L. GENEVOIS, 1928).

Le tissu à étudier est divisé en petits morceaux et mis en suspension dans une solution appropriée. Un volume constant de cette suspension et voisin de 2 cc est placé dans un petit récipient relié à un manomètre, le tout formant un système parfaitement clos. Le récipient est pourvu d'un godet intérieur, destiné à recevoir la soude qui absorbe au fur et à mesure le gaz carbonique dégagé par la respiration du tissu, lorsque l'on veut étudier le O_2 consommé.

b) Erreurs des mesures.

Les causes d'erreur de la méthode de WARBURG appliquée à *B. xylinum* sont peu importantes ;

1° — L'erreur de lecture des dénivellations manométriques est

très faible et, puisque l'observateur est toujours le même, les erreurs sont toutes de même sens.

2° — L'erreur due à la pesée de zooglée n'intervient que dans la détermination des I_{02} qui est déjà dans notre cas une valeur arbitraire : le poids de bactéries vivantes et le poids de zooglée étant considérés comme proportionnels.

3° — L'erreur due à la détermination du pH, celui-ci influant sur la consommation d'oxygène. Pour cette raison nous avons choisi les pH des expériences dans la région où les variations de celui-ci ont une moindre importance.

4° — L'erreur due à la pesée de la substance étudiée ; elle est rendue minimum en employant la concentration de 4 % pour laquelle les variations de consommation d'oxygène corrélatives aux variations de concentration sont relativement faibles.

5° — L'erreur due à l'agglutination de petits fragments de zooglées qui influent sur la régularité de la consommation d'oxygène. A pH 3 et 4 cette agglutination est presque de règle et elle a lieu même à pH 5, mais jamais à un pH moins acide et pour cette raison nous avons effectué nos expériences entre pH 5,5 et pH 6,5.

Malgré ces faibles causes d'erreur, il se trouve de temps en temps des résultats aberrants : une zooglée respire beaucoup plus que la plupart des zooglées. Pour éviter l'utilisation de chiffres ainsi faussés, nous avons employé le plus souvent possible la méthode d'addition de la substance au cours de l'expérience alors que l'on connaît déjà la consommation d'oxygène dans le milieu sans aliment. Quand ceci n'est pas possible, parce qu'une autre substance doit être ajoutée, nous avons cependant un point de repère par le témoin sans aliment que nous avons conservé dans chaque expérience.

Les résultats donnés dans les tableaux sont les seuls résultats normaux, les résultats aberrants étant éliminés.

Il ne faut cependant pas attribuer aux chiffres donnés une importance absolue, on voit d'ailleurs que même dans des conditions identiques, avec des témoins consommant exactement les mêmes quantités d'oxygène on n'obtient pas toujours les mêmes résultats. Ce qui est absolument certain, c'est l'ordre de grandeur et le sens de variation des expériences.

c) Préparation des zooglées, détermination des poids secs.

Le milieu sur lequel nous avons cultivé les bactéries destinées

à l'étude était de l'autolysat de levure préparé comme nous l'avons déjà indiqué, dilué de manière à contenir 5 g. par litre d'extrait sec et additionné de 40 g. par litre de glycérol. Les zooglées apparaissent après 4 ou 5 jours de culture à 27°. Une première expérience nous a montré que le liquide était trop pauvre en bactéries pour permettre une mesure de la respiration, comme l'indiquent les chiffres ci-dessous :

2 cc³ liquide seul : 1 mm³ d'oxygène consommé par heure.

2 cc³ de liquide contenant un hachis de zooglée correspondant à 25 mg. de zooglée sèche : 16 mm³ d'oxygène consommé par heure.

On voit au contraire que les zooglées sont fort riches et pour toutes nos expériences nous avons utilisé des zooglées provenant de cultures faites dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 cc³ à raison de 20 cc³ de liquide par fiole soit dans une couche de 5 mm.

Les membranes ainsi préparées étaient de dimensions constantes : 7 cm de diamètre, la surface étant celle du fond de la fiole, l'épaisseur celle du liquide, soit environ 28 cm² de surface, 14 cc³ de volume

Le tableau ci-dessous indique le poids moyen des zooglées d'après leur âge. Nous avons toujours considéré la quantité de bactéries présentes comme proportionnelle au poids de membrane utilisé :

$q \text{ bactéries} = p \text{ poids de zooglées} \times K.$

K est presque impossible à déterminer étant donnée l'étroite liaison des bactéries et de la membrane qu'elles secrètent .

Nous avons les poids secs des zooglées :

POIDS DE ZOUGLÉES SÈCHES EN MG.

1/2	zooglée	de	9 jours	106	104
—	—	10	—	123	124
—	—	16	—	113	128
—	—	20	—	120	126
—	—	25	—	69	90
Moyenne				105	112
Poids moyen d'une zooglée : 105 + 112 = 217 mg.					

Or, on utilise en général 1/8 environ de zooglée fraîche soit environ 27 mg. de zooglée sèche. En pesant à plusieurs reprises le poids de zooglée utilisée, nous avons toujours trouvé des chiffres très voisins de 25 mg. Dans toutes les expériences nous nous sommes basée sur ce chiffre pour calculer les I₀.

Avant d'être utilisées, les zooglées bien égouttées sont lavées

à l'eau jusqu'à ce que le liquide de lavage ne donne plus la réaction de la dioxycétone, (mais sans exagérer pour éviter d'arracher les corps microbiens à la membrane) elles sont ensuite lavées avec le milieu dans lequel elles doivent être étudiées afin d'en être bien imprégnées.

Chaque zooglée est alors divisée en huit morceaux égaux, un de ceux-ci séché à l'étuve peut servir de vérificateur du poids.

Chacun des autres huitièmes est déposé sur un verre de montre avec la solution dans laquelle on veut l'étudier, il y est laissé quelques minutes puis on décante ce liquide, et la zooglée est finement hâchée avec de bons ciseaux sur le verre de montre et introduite dans un des petits récipients décrits ci-dessus, avec deux cc³ de solution, de manière à obtenir une suspension homogène.

La substance à étudier est dissoute au préalable dans la solution à raison de 4 g. % ou bien 0,4 cc³ d'une solution à 20 % sont placés dans l'ampoule latérale et ajoutés au cours de l'expérience.

Nous avons toujours employé des solutions tampons, afin de maintenir aussi constantes que possible les conditions de l'expérience. Deux types de tampons ont été utilisés : des tampons au phosphate (phosphate monopotassique et phosphate dipotassique) et tampons au citrate (acide citrique et soude). Dans l'étude de l'influence des tampons nous verrons que notre choix s'est porté sur les tampons au citrate et pourquoi.

Sauf indication contraire, toutes les expériences ont été effectuées à la température de 25°, pendant 1 h. 30 ou 2 h. , avec un tampon citaté, en employant la concentration de 4 % pour la substance étudiée et en utilisant 25 mg. de zooglée (ou plus exactement en employant un poids de zooglée correspondant à 25 mg. de zooglée sèche.)

L'âge de la zooglée utilisée pour chaque expérience est toujours indiqué et la valeur du pH de la solution, pH mesuré par la méthode des indicateurs de CLARK.

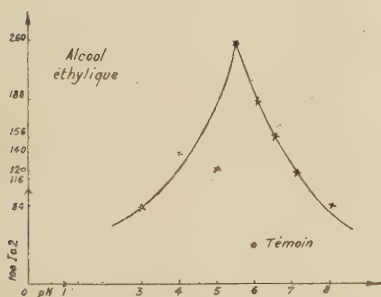
Dans tous les tableaux et dans toutes les courbes, les I_{02} sont exprimés en 100 I_{02} étant donnée leur faible valeur, en effet, pour le témoin, I_{02} serait 0,4 et 100 I_{02} devient 40. Les chiffres sont ainsi plus facilement comparables.

Influence du pH.

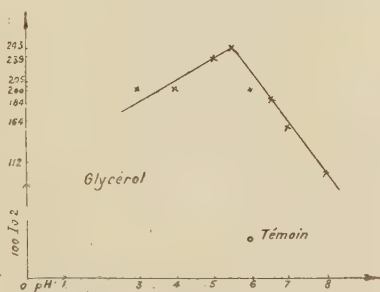
Les quatre courbes ci-après expriment les variations des I_{02} en fonction du pH sur différents aliments : alcool éthylique, gly-

cérol, glucose, glycol. Les trois premières sont favorables à la croissance de *B. xylinum*, le glycol non.

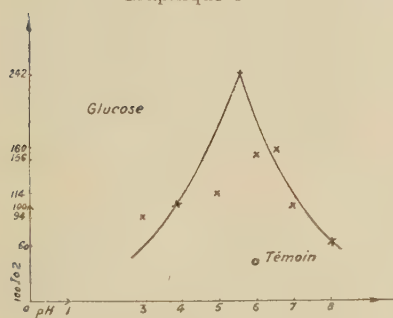
On voit que la consommation d'oxygène est très faible pour ce dernier, mais pour les trois autres qui représentent les principaux types d'action de *B. xylinum*, les courbes sont semblables : elles ont toutes trois un point de rebroussement très net pour pH



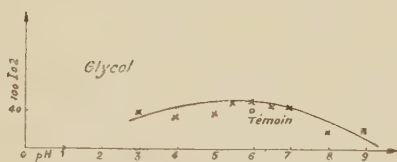
Graphique 9



Graphique 10



Graphique 11



Graphique 12

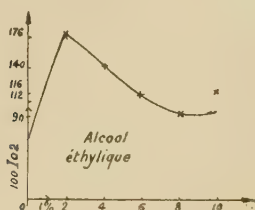
5,5. Nous avons déjà vu que l'agglutination empêchait d'opérer un pH inférieur à 4, ce point de rebroussement est aussi à éviter et nous avons en conséquence opéré habituellement à un pH voisin de 6.

Influence du tampon.

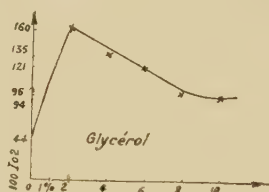
Nous avons comparé la consommation d'oxygène de *B. xylinum* dans les différents milieux avec les tampons phosphate et citrate et avec le milieu non tamponné. Etant donné la formation d'acide dans le cas de la respiration sur alcools ou oses, il est préférable d'employer toujours un tampon.

Il semble bien de plus que le tampon citrate soit préférable

au tampon phosphate pour deux raisons : les résultats se rapprochent davantage de ceux que l'on obtient dans le milieu non tamponné, de plus les consommations d'oxygène dans les milieux au citrate sont plus constantes que dans les milieux au phosphate.



Graphique 13



Graphique 14

Ainsi dans des conditions analogues, en milieu phosphaté avec l'alcool éthylique comme aliment, I_{02} varie de 1,68 à 5, cependant que les I_{02} des témoins varient de 0,44 à 0,48. De même pour le glucose I_{02} varie de 1,56 à 3,16. Dans les milieux au citrate, I_{02} varie pour l'alcool éthylique de 1,14 à 1,48 et pour le glucose de 1,00 à 1,08.

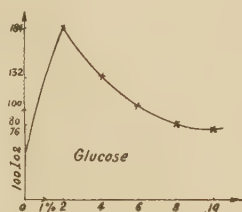
Tableau 7.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU TAMPON

AGE DES ZOOGLEES	DATES DES EXPÉRIENCES				
	5/12/32	3/11/32	29/10/32	23/12/32	28/10/32
	15 jours	13 jours	10 jours	15 jours	12 jours
Aliment	Sans tampon	tampon phosphate	tampon phosphate	tampon citrate	tampon citrate
Témoin sans aliment	43	44	48	53	52
Alcool éthylique	114	168	300	114	148
Glycérol	164	120	184	180	168
Glucose	100	156	316	100	108
Glycol	22	41		30	

Influence de la concentration en aliment.

Les courbes 13, 14, et 15 indiquent les variations des I_{02} sous l'influence des variations des concentrations en aliment. On voit que les concentrations élevées ont une action inhibitrice. Nous avons toujours opéré avec une concentration de 4 %.



Graphique 15

Influence de l'âge de la zooglée.

Quel que soit le milieu, les zooglées de 9 à 16 jours consomment des quantités à peu près constantes d'oxygène permettant d'avoir ainsi, d'une zooglée à l'autre, des résultats comparables.

Dans toutes nos expériences nous avons indiqué l'âge des zooglées utilisées qui étaient naturellement choisies entre ces limites d'âge.

Tableau 8.

ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA ZOOGLEE.

Concentration en aliment : 4 %.

100 I_{02} à T. = 25°

pH = 6 avec tampon acide citrique et soude.

	DATES		
	19 /12 /32	8 /12 /32	20 /12 /32
ÂGE DE LA ZOOGLEE EN JOURS	ALCOOL	GLUCOSE	GLYCÉROL
3	176	176	123
6	125	111	94
9	184	156	182
10	190	160	184
16	200	180	218
20	44	112	48
25	40	80	36

Classification de différents corps par leur influence sur la consommation d'oxygène de B. xylinum.

Nous avons effectué les expériences suivantes : addition de l'aliment à un milieu tamponné au citrate et à un milieu tamponné au phosphate. Les résultats ne sont pas sensiblement différents. On voit (tableau 9) que les corps utilisés peuvent, comme nous l'avons déjà indiqué, être classés en trois catégories : les uns, comme l'alcool éthylique, le glycérol, le lévulose, le glucose, la monoacétine du glycérol, augmentent considérablement la consommation d'oxygène de la zooglé, 100 I₀₂ passe de 40 environ à au moins 160 ; les autres, comme l'autolysat de levure, la diacétine du glycérol, n'ont pas d'influence prononcée sur la consommation d'oxygène qui se maintient au niveau de celle du témoin ; enfin une troisième catégorie comprend les corps qui, comme le glycol, la triacétine du glycérol, abaissent la consommation d'oxygène, 100 I₀₂ descendent à 25 environ.

On serait tenté, après la première heure d'expérience de ranger l'éthylglycol par exemple dans le premier groupe, cependant en prolongeant l'expérience pendant trois heures, on voit (tableau 10) que la consommation d'oxygène ne se maintient constante que pour la première catégorie de corps : le galactose, le saccharose, l'alcool éthylique, l'alcool propylique, le sorbitol, le mannitol, le mannose le glucose, alors qu'elle diminue considérablement pour le lactose, l'alcool méthylique, le méthylglycol, l'éthylglycol, les acétates de méthyl et d'éthylglycol. L'addition de la substance a produit une espèce de « coup de fouet », mais l'excitation ne s'est pas prolongée.

De tous les corps essayés seul parmi ceux qui font partie du premier groupe, la monoacétine du glycérol n'avait jamais été utilisée comme substrat de croissance de *B. xylinum* et nous avons été heureuse d'obtenir avec cet aliment de magnifiques zooglées. Nous n'avons pas obtenu de culture sur la diacétine, sur la triacétine du glycérol, ni sur les acétates de méthyl et d'éthyl glycol, comme il était d'ailleurs à prévoir, d'après l'effet de ces corps sur la respiration de *B. xylinum*. En somme, la bactérie oxyde les molécules qui lui servent d'aliment de croissance et celles-là seulement.

Tableau 9.

SUBSTANCE NUTRITIVE DANS L'AMPOULE LATÉRALE VERSÉE
APRÈS UNE HEURE D'EXPÉRIENCEConcentration en aliment : 4 %
pH : 6100 Io^2 à $T = 25^\circ$

AGE DES ZOOGLEES TAMPON	DATES DES EXPÉRIENCES			
	3 /11 /32 10 JOURS PHOSPHATE		3 /12 /32 11 JOURS CITRATE	
Aliment	Io^2 Avant	Io^2 Après	Io^2 Avant	Io^2 Après
Témoin	44	44	48,4	48,4
Alcool éthylique.....	(126) ¹	168	(120) ¹	184
Glycol			47,6	25
Glycérol	48	164	48	184
Monoacétine du glycérol			48	180
Diacétine du glycérol..			48	46
Triacétine du glycérol..			47	32
Glucose	41	166		
Lévulose	50	186		
Ethylglycol			48	80
Autolysat de levure	44	72		

§ 4. — Alcools simples.

Comme l'indique le tableau ci-après, l'alcool éthylique est très favorable à la respiration de *B. xylinum*. L'alcool propylique un peu moins, mais l'alcool butylique est toxique et l'alcool amylique encore plus. H. QUÉRÉ (1931) a trouvé sur une bactérie acétique (Bordeaux) que les « consommations en oxygène sont grossièrement en raison inverse du poids moléculaire de l'alcool considéré ». Nos résultats n'ont pas abouti à une loi aussi précise, cependant ils suivent la règle énoncée par E. DUCLAUX : « d'une manière générale à partir de l'alcool éthylique, les alcools sont d'autant plus antiseptiques que le nombre de leurs atomes de carbones est plus élevé »

(1) L'alcool éthylique agit déjà de l'ampoule.

Tableau 10.

ÉTUDE DE LA FATIGUE DE LA ZOOGÉE DANS LES MILIEUX QUI LUI DÉPLAISENT.
Concentration en aliment : 4 %.

100 I₀² à T = 25°

AGE DES ZOOGÉES TAMPON ALIMENT	DATES DES EXPÉRIENCES									
	21/11/32		18/11/32		4 et 9/11/32		29/11/32			
	11 JOURS		13 JOURS		12 JOURS		13 JOURS			
	1 ^e h.	3 ^e h.	1 ^e h.	3 ^e h.	1 ^e h.	3 ^e h.	1 ^e h.	3 ^e h.	1 ^e h.	3 ^e h.
	PHOSPHATE pH 7		CITRATE pH 6		CITRATE pH 6,5		CITRATE pH 6,2			
	ALIMENT		ALIMENT		ALIMENT		ALIMENT			
Témoïn	52	52	44	43	Témoïn	44	Glycol	40	28	
Arabinose ...	36	12	80	16	Sorbitol	144	Méthylglycol.	44	28	
Galactose	100	76	240	232	Mannitol	96	Ethylglycol..	84	48	
Saccharose ...	124	124	168	144	Mannose	124	méthylglycol.	44	32	
							Acétate			
Maltose	72	12	40	16	Glucose	156	d'éthyl-glycol.	48	36	
Lactose	44	16			Alcool éthylque ..	164				

Tableau 11

ALCOOLS SIMPLES

Concentration en aliment 4 % 100 I₀² à T = 25°.
 Tampon acide citrique et soude.

pH		DATES DES EXPÉRIENCES		
		18 /11 /32	9 /12 /32	12 /12 /32
		6	6,2	6,5
ALIMENT	POIDS MOLÉCU- LAIRE	AGE DES ZOOGLEES		
		13 jours	13 jours	13 jours
Témoin		44	52	48
Alcool méthylique.	32	80	74	57
— éthylique	46	240	232	159
— propylique	60	168	144	74
— butylique.	75	40	26	22
— amylique	88	4	22	12

§ 5. — Polyalcools.

Des polyalcools étudiés on voit que seul le dulcitol n'est pas favorable à la respiration de *B. xylinum*. Après une heure 1/2 d'expérience à pH 5,5 et 6, 100 I₀² sont peu supérieurs au témoin ; à pH 6,5, 100 I₀² sont extrêmement faibles. Ce polyalcool est également le seul des sept qui ne permette pas la croissance de la bactérie, cependant que les autres donnent tous de belles cultures avec production de sucres réducteurs. Le glycérol, qui est l'aliment préféré de *B. xylinum*, est très favorable à la respiration, l'érythritol l'est un peu moins, le sorbitol et le mannitol sont aussi très appréciés, l'α et le β glucoheptitol, polyalcools en C⁷, consomment un peu moins d'oxygène que les polyalcools à nombre d'atomes de carbones moins élevés.

En plus de l'influence des polyalcools sur la consommation d'oxygène de la bactérie, on voit sur ce tableau l'influence des variations du pH entre 5,5 et 6,5 : 100 I₀² diminuent progressivement, comme l'avaient déjà indiqué les courbes 10, 11, et 12.

Tableau 12.
POLYALCOOLS

Concentration en aliment : 4 % 100 Io² à T. = 25°.
Tampon acide citrique et soude.

pH	DATES DES EXPÉRIENCES		
	25 /11 /32	2 /12 /32	9 /11 /32
	5,5	6	6,5
ALIMENT	AGE DES ZOGLÉES		
	11 jours	12 jours	12 jours
Témoin.	52	44	48
Glycérol	243	220	184
Erythritol	196	119	78
Sorbitol	239	196	136
Mannitol	232	144	96
Dulcitol.	68	68	8
α Glucoheptitol	120	102	60
β Glucoheptitol	115	115	56

§ 6. — Esters et éthers de polyalcools.

a) Acétines du glycérol.

Nous avons vu que le glycol est favorable à la respiration comme à la croissance de *B. xylinum*. Sur la monoacétine du glycérol

Tableau 13.
GLYCEROL ET DÉRIVÉS

Concentration en aliment 4 %. 100 Io² à T. = 25°
Tampon acide citrique et soude.
pH : 6

ALIMENT	DATES DES EXPÉRIENCES	
	17 /12 /32	8 /1 /33
ALIMENT	AGE DES ZOGLÉES	
	14 jours	13 jours
Témoin	40	45
Glycérol.	200	191
Monoacétine	180	195
Diacétine.	68	60
Triacétine.	28	38

la bactérie consomme une quantité d'oxygène presque aussi grande que sur le glycérol lui-même. Cependant que I_{02} baissé beaucoup pour la diacétine et qu'il est très faible pour la triacétine.

Tous les aliments de croissance peuvent être oxydés par la bactérie et inversement tous les aliments oxydés peuvent servir d'aliments de croissance et ceux-là seulement. C'est ainsi que l'on obtient de magnifiques cultures sur la monoacétine du glycérol et que nous n'avons réussi à cultiver *B. xylinum* ni sur la di, ni sur la triacétine.

b) Quelques dérivés du glycol.

Il ne nous a pas été possible de confirmer les expériences de VISERT'HOOF. Nous pouvons donc affirmer avec G. BERTRAND que le glycol n'est pas un aliment de croissance pour *B. xylinum*. Nous avons tout lieu de supposer qu'il ne serait pas favorable à la respiration et nos résultats ont confirmé nos prévisions comme il ressort de la courbe 12 et des tableaux 7, 10 et 14.

Tableau 14.

GLYCOL ET DÉRIVÉS

Concentration en aliment 4 %. 100 I_{02} à T : 25°.
pH = 6,2 avec tampon acide citrique et soude.

ALIMENT	DATES DES EXPÉRIENCES	
	29 /11 /32	30 /11 /32
	AGE DES ZOOGLÉES	
	13 jours	14 jours
Témoin	43	52
Glycol	40	41
Méthylglycol.....	46	48
Ethylglycol.....	84	92
Acétate de méthylglycol	45	
Acétate d'éthylglycol	49	54
Monoformine du glycol.....		83
Monochlorhydrine du glycol	0	0

Aucun des dérivés du glycol étudiés n'est alimentaire pour la bactérie, la monochlorhydrine du glycol est même un véritable in-

hibiteur. D'après le tableau 15, la consommation d'oxygène sur l'éthylglycol est relativement élevée au cours d'une heure d'expérience ; cependant l'examen du tableau 10 montre qu'après 3 heures elle a baissé considérablement.

§ 7. — Oses et osides.

a) Aldoses.

Le glucose et le mannose sont parmi les aldoses étudiés les plus favorables à la respiration de *B. xylinum*. Tous deux sont également d'excellents aliments de croissance : ils sont d'abord transformés en acide gluconique et mannonique, puis en acide céto-gluconique et céto-mannonique.

Tableau 15.

ALDOSES

Concentration en aliment : 4 %
Tampon acide citrique et soude.

100 Io² à T : 25°.

pH	DATES DES EXPÉRIENCES		
	17/12/32	5/11/32	4/11/32
	5,5	6,5	6,5
ALIMENT	AGE DES ZOOGLÉES		
	13 jours	12 jours	11 jours
Témoin	40	44	52
Arabinose.....	32	48	36
Xylose	100	120	120
Glucose.....	240	156	152
Mannose	204	124	102
Galactose	100	112	100

Le xylose et le galactose sont encore de bons aliments de croissance et de respiration, mais l'arabinose est peu favorable ; suivant G. BERTRAND, la croissance est difficile quoique l'on obtienne un peu d'acide arabonique ; suivant TARR et HIBBERT elle est impossible. Nous avons trouvé que la consommation d'oxygène sur arabinose était à peu près la même que celle du témoin minéral. Les variations de pH ont l'influence déjà signalée.

b) Cétoses et homoglucides.

Les deux cétoses utilisées : la dioxyacétone et le lévulose sont pour la bactérie des aliments de choix ; ce sont tous deux des produits de l'activité de *B. xylinum*, l'un sur le mannitol, l'autre sur la ~~dioxyacétone~~ *glycérol*.

Le saccharose donne également de belles membranes et sur saccharose la zooglée consomme une quantité élevée d'oxygène.

Quant au maltose et au lactose, qui ne permettent pas la croissance, ce sont des « inhibiteurs » comme il ressort de ce tableau et de celui qui est relatif à la fatigue des zoogléas. (10)

L'expérience du 7/11, effectuée à pH 5,5 alors que les deux autres expériences sont effectuées à pH 6,5, montre, conformément au résultat déjà connu, l'augmentation de consommation d'oxygène pour ce pH.

Tableau 16.

CETOSSES ET HOMOGLUCIDES

Concentration en aliment : 4 %
Tampon acide citrique et soude.

100 I₀² à T : 25°

pH	DATES DES EXPÉRIENCES		
	7/11/32	19/11/32	17/12/32
	5,5	6,5	6,5
ALIMENT	AGE DES ZOGLÉES		
	11 jours	11 jours	13 jours
Témoin	52	44	44
Dioxyacétone	220	176	176
Lévulose	184	100	104
Saccharose	239	239	124
Maltose	72	32	28
Lactose	44	44	32

Le tableau 17, pendant du tableau 4 sur la croissance, donne un résumé des résultats obtenus par l'étude de la respiration de *B. xylinum* sur divers alcools et polyalcools. Les chiffres sont donnés à un pH voisin de 6, à 25°, en prenant comme unité la consommation moyenne d'oxygène sur le témoin au citrate, soit 100 I₀² = 40.

Par conséquent, le glycérol pour lequel 100 I_{0^2} dans l'expérience du 3/12/32, tableau 10, par exemple, est égal à 184, devient : $184 - 40 = 144$. Le glycol pour lequel après une heure d'expérience (28/11 32) $100 I_{0^2} = 40$ devient dans le nouveau tableau $40 - 40 = 0$ et après 3 heures $28 - 40 = -12$.

Il faut en réalité, n'attacher d'importance qu'aux deux premiers chiffres, le chiffre des unités n'étant pas toujours exactement le même. Ainsi 144 pour le glycérol doit être considéré comme environ 140.

Tableau 17.

RESPIRATION DE *B. XYLINUM* SUR DIVERS ALCOOLS
ET POLYALCOOLS

100 I_{0^2}	1	2	3	4	6	7
Après 1 h.	Méthyl + 40					
— 3 h.	— 24					
	Ethyl	Glycol				
— 1 h.	+ 200	0				
— 3 h.	+ 198	— 12				
— 1 h.	Propyl + 128					
— 3 h.	+ 120					
			Glycérol			
— 1 h.			+ 144			
— 3 h.			+ 144			
— 1 h.	Butyl 0			Erythritol + 74		
— 3 h.	— 24			+ 70		
— 1 h.	Amyl — 36					
— 3 h.	— 36					
— 1 h.					Mannitol + 56	
— 3 h.					+ 56	
— 1 h.					Sorbitol + 104	
— 3 h.					+ 92	
— 1 h.					Dulcicol + 28	
— 3 h.					+ 18	
— 1 h.						α gluco- heptitol- + 62
— 3 h.						+ 60
— 1 h.						β gluco- heptitol- + 75
— 3 h.						+ 72

On voit la distinction très nette entre les aliments favorables : alcool éthylique, glycérol, mannitol par exemple, indifférents : dulcitol et toxiques : alcool butylique, alcool amylique.

Le déterminisme de l'attaque des alcools et des sucres par la bactérie est à coup sûr complexe, et dépend de plusieurs facteurs. Il semble que le facteur essentiel soit « l'instabilité » de la molécule, notion qui peut paraître obscure, mais qui peut se préciser assez facilement. Des facteurs secondaires viennent masquer le facteur primaire. Ce facteur primaire peut se résumer ainsi : la possibilité pour la bactérie d'activer deux atomes de carbone consécutifs. Cette activation est possible à condition d'avoir à côté de la fonction alcool primaire :

1° — un groupement CH^3 ou C^2H^5 , mais non un groupement plus élevé.

2° — une fonction alcool secondaire.

Ainsi, des alcools simples, seuls les alcools éthylique, propylique normal et iso, sont attaqués. Les alcools supérieurs ne le sont plus. Peut être faut-il ne voir ici qu'un effet de la liposolubilité des alcools supérieurs, leur donnant un pouvoir narcotique élevé.

Parmi les polyalcools, le glycol, ses esters, ses éthers, ne sont pas oxydés : les deux fonctions alcools primaires seraient trop stables. Par contre, le glycérol, ses monoesters et monoéthers sont attaqués : dès que la deuxième fonction alcool est immobilisée (diacétine) le corps cesse d'être attaquant. Inversement, si l'on introduit deux fonctions alcools ou davantage, dans une molécule en C^4 : par exemple butylèneglycol, érythritol, le corps devient attaquant. Ainsi, nous trouvons le résultat suivant, en apparence paradoxal : le glycol n'est pas attaqué, mais le dérivé de substitution qu'est le butylène glycol :



est attaqué, ainsi que le propylglycol.

S'il est permis de risquer une hypothèse, on peut imaginer que le corps attaquant est celui qui donne un alcool vinylique dissymétrique par déshydrogénation.

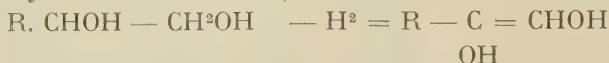
Ainsi les alcools gras :



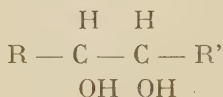
les alcools secondaires :



les polyalcools :

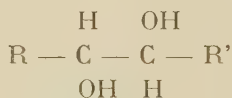


Toutefois les polyalcools deviennent inattaquables suivant la règle de BERTRAND, lorsque les deux groupements OH voisins sont alternés ; cela se comprend aisément, si l'on se représente les groupements OH chargés, négativement, les H chargés positivement : dans la position :



Les OH se repoussent, ils sont instables, le corps est attaquable.

Dans :



Les H et OH se consolident réciproquement, le corps est inattaquable.

Les groupements CH^3 sont électropositifs ; ils « stabilisent » par conséquent les groupements OH : c'est la raison sans doute pour laquelle l'alcool butylique n'est pas attaqué.

CHAPITRE V

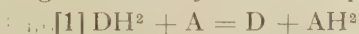
COLORANTS

- § 1. Introduction.
- § 2. Action des colorants en aérobiose.
 - a) sur la croissance.
 - b) sur la respiration.
- § 3. Potentiel limite d'oxydoréduction de *B. xylinum* en anaérobiose.
- § 4. Vitesse d'oxydoréduction.
- § 5. Croissance anaérobie de *B. xylinum*. Milieux permettant la croissance.
- § 6. Signification des résultats.

§ 1. — Introduction.

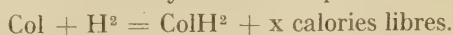
La notion de potentiel d'oxydoréduction, son application à des milieux biologiques est exposée dans des mémoires et ouvrages récents ; le plus complet de ces exposés est celui de R. WURMSER (1930). E. AUBEL et L. GENEVOIS (1928), L. MICHAËLIS (1929) avaient décrit rapidement ce nouveau système de notions. Les principes mêmes du calcul dans le cas des solutions et des composés quinoniques a été donné par HABER et ses élèves dès 1905 (voir le traité de FOERSTER 1920). W. CLARK a introduit en 1926 la notion de rH^2 , qui est un artifice de calcul fort commode pour exprimer les résultats obtenus en biologie.

Les potentiels d'oxydoréduction permettent de connaître l'énergie libre des systèmes tels que :



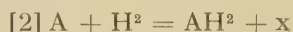
où il y a transport d'hydrogène d'une molécule D qui est le « donateur » à une molécule A qui est « l'accepteur ». D s'oxyde, A est réduit.

Les recherches des auteurs cités plus haut ont permis d'établir une classification des systèmes tels que :



Col désignant un colorant susceptible de jouer le rôle d'accepteur d'hydrogène A dont la forme réduite ColH² est incolore ou autrement colorée que la forme oxydée. Les colorants sont classés par la valeur de l'énergie libre x, x est proportionnel au « potentiel » que le système exerce sur une électrode de platine polie.

La gamme de colorants, c'est-à-dire d'accepteurs A, une fois repérée permettra d'étudier des systèmes tels que DH². C'est ainsi que le glucose et les autres hexoses fermentescibles [E. AUBEL, L. GENEVOIS, R. WURMSER (1926), WURMSER et ses collaborateurs, (1927-1930)], l'aldéhyde acétique (Cl. FROMAGEOT), l'acide lactique (WURMSER, MAYER-REICH, 1933) l'acide succinique (QUASTEL) ont été étudiés. Pour que la réaction [1] ait lieu, il faut que l'énergie libre du système



soit plus grande que l'affinité de H² pour D.

Pour que [1] ait lieu il faut choisir A de telle façon que x soit supérieur à x₀.

x₀ représentant un minimum d'énergie libre nécessaire pour que la réaction ait lieu.

Si nous ne sommes plus en milieu minéral, nous n'avons plus aucune certitude sur D : la cellule vivante se combine aux molécules en solution, et, c'est le complexe cellule vivante + molécules organiques qui représente D.

Il nous faut donc pour chaque cellule vivante et pour chaque molécule-aliment, soit pour chaque molécule susceptible de former un complexe avec la cellule, ou d'être activée par la cellule, connaître l'énergie libre minima x₀, permettant à la réaction [1] de se produire ou, ce qui revient au même, connaître le potentiel d'oxydoréduction du système [1].

Un certain nombre de bactéries anaérobies ont été ainsi étudiées, depuis le travail de pionnier de GILLESPIE (1920); J. H. QUASTEL, par sa méthode des « resting bacteria » a étudié surtout avec le *B. coli* divers systèmes chimiques dont le plus remarquable est l'équilibre :



A ma connaissance, aucune bactérie acétique, acétogène, ou acétogène n'a été étudiée au point de vue des potentiels d'oxydoréduction ; d'autre part, les mono et polyalcools ont été très peu étudiés comme donateurs : ces corps, relativement stables, ne réagissent pas en milieu minéral, et souvent assez mal en présence des cellules vivantes. Il était important d'utiliser le pouvoir remarquable d'activation de la fonction alcool de *B. xylinum* pour connaître les propriétés de ces corps.

WIELAND en 1913, WIELAND et BERTHO en 1928, REID en 1931, ont fait réduire du bleu de méthylène par des bactéries acétiques : ils ont comparé la vitesse de ce phénomène d'oxydoréduction à la vitesse d'oxydation par l'oxygène atmosphérique : l'oxydoréduction marche 10 à 100 fois plus lentement que l'oxydation directe. Cette proportion se retrouve avec *B. xylinum*. Aucun auteur n'a utilisé une gamme de colorants : la vitesse avec laquelle les colorants sont réduits a peu d'importance, en fonction de cette notion, que certains colorants ne seront jamais réduits, parce que libérant une quantité d'énergie trop faible dans leur réduction. L'étude d'une gamme de colorants a permis de déterminer le potentiel limite atteint par la suspension de bactéries en anaérobiose.

Aucun auteur n'a essayé de faire croître en anaérobiose des bactéries acétiques aux dépens de la réaction d'oxydoréduction. L'expérience méritait d'être tentée, car elle donne un résultat nettement positif : *B. xylinum* forme sa zooglye de cellulose en anaérobiose absolue dans le vide, à condition que le milieu contienne une quantité suffisante et pas trop grande, d'un colorant de potentiel d'oxydoréduction convenable. Ainsi une bactérie aérobie peut croître en anaérobiose ; ainsi des réactions productrices d'énergie très différentes peuvent permettre la croissance.

§ 2. — Action des colorants en aérobie.

a) sur la croissance.

Nous avons étudié l'action de quelques colorants vitaux : vert janus, phénosafranine, bleu de méthylène, bleu de crésyl, thionine, à différentes concentrations sur la croissance de *B. xylinum* en aérobie. Les milieux utilisés étaient, soit de l'autolysat de levure habituel, soit le milieu indiqué par TARR et HIBBERT (1930)

et composé de 0,50 % d'alcool éthylique, 1% d'asparagine, 0,5 % KH_2PO_4 , 0,1 % Na Cl. L'un ou l'autre de ces milieux était additionné de 4 % de glucose, de glycérol ou d'alcool, et réparti dans des tubes à essais à raison de 10 cm³ par tube.

Les colorants ont été ajoutés après stérilisation à l'autoclave à 118° pendant 20 minutes.

Il n'y a pas de différence sensible dans l'action des colorants vitaux sur le milieu à base de levure et sur le milieu parfaitement synthétique. Nous n'avons pas constaté non plus de différence essentielle, entre l'action des divers colorants sur les trois principaux types d'oxydation par *B. xylinum* : passage de l'aldose au polyalcool-acide, du polyalcool au cétose, de l'alcool à l'acide. La thionine seule semble favoriser de préférence les cultures sur alcool.

Les concentrations employées s'échelonnent de $1/2 \times 10^6$, à $1/2 \times 10^3$ et les quantités de semence, rigoureusement identiques, sont 0, cc01 d'une dilution de 1 cc d'une culture de 5 à 6 jours de *B. xylinum* dans 10 cc d'eau distillée.

Dans le cas de la thionine et du bleu de crésyl, dès le lendemain de l'ensemencement, les tubes contenant de 40 à 400 mgr de colorant par litre, renferment déjà une jolie zoogée, alors que les témoins ne possèdent pas le moindre flocon, et ils gardent tous leur avance pendant 5 jours. Après ce laps de temps, seuls les tubes contenant 80 à 240 mgr de thionine et de vert janus par litre et 100 mgr de bleu de crésyl sont supérieurs aux témoins ; ils le restent pendant 10 jours, puis ils sont rattrapés par les témoins. D'autre part, les doses supérieures à 500 mgr sont toxiques, et 700 mgr empêchent complètement la croissance. Nous croyons pouvoir conclure de cet ensemble de faits à l'action favorisante du vert janus, du bleu de crésyl, et de la thionine. Elle est surtout marquée pour ces deux derniers colorants, et n'est que de faible durée à cause de l'insuffisance de colorant dont les doses plus élevées sont toxiques et qu'il faudrait pouvoir renouveler au cours de la croissance, mais ceci est très délicat à cause de la sensibilité de *Bacterium xylinum* qui s'infecte très facilement.

Il nous semble possible de rapprocher ce phénomène de l'augmentation catalytique de la respiration par des colorants vitaux étudiée par L. GENEVOIS (1928) et de la stimulation de la croissance du riz par ces mêmes colorants découverte par A. RADOËFF (1932).

b) sur la respiration.

On savait depuis les travaux de PALLADINE (1911) que le bleu de méthylène augmente l'intensité respiratoire des cellules végétales; GENEVOIS a généralisé l'action des colorants vitaux sur la respiration (1928). Tous les colorants basiques possédant un potentiel d'oxydo-réduction tel qu'ils soient susceptibles d'être réduits par le lévulose sont capables d'augmenter catalytiquement la respiration des algues vertes unicellulaires du groupe des chlorelles, dans des proportions considérables (300 à 500 %), les colorants non réductibles par les hexoses, à potentiel d'oxydo-réduction très bas ont une action non négligeable mais faible. Les colorants acides qui ne pénètrent pas dans les cellules, n'ont aucune action sur la respiration, ce qui montre que la respiration n'est pas localisée sur la membrane cellulaire.

Toutes ces conclusions sont rapidement devenues classiques et confirmées en particulier par ALBACH et BECKER. Marc CHAPHEAU a retrouvé un phénomène analogue en travaillant sur les hématies de Siponcle (1928, 1930) et sur les tissus d'Huître (1932): les colorants de potentiel élevé déterminent pendant quelques heures une augmentation notable de la respiration cellulaire mais qui va en diminuant avec le temps, les colorants de faible potentiel d'oxydo-réduction n'ont aucune action, non plus que les colorants acides.

Les colorants vitaux ont une très faible action sur la respiration de *B. xylinum*, l'action la plus prononcée est celle du bleu de méthylène. Le bleu de méthylène n'a pas une action constante sur la respiration de *B. xylinum*. Deux cas se présentent: ou le bleu de méthylène a une action stimulante ou il n'en a pas. Nous avons été embarrassée pour distinguer les deux cas, étroitement mêlés. Nous avons cru d'abord à l'action stimulante sur les « vieilles » zooglées mais ce résultat n'était pas constant; il nous semble cependant bien établi que le bleu de méthylène favorise la respiration des zooglées « fatiguées ». Nous avons vu des zooglées dont la consommation d'oxygène avait beaucoup baissé, remonter aux chiffres élevés du début de l'expérience, par addition de bleu de méthylène. Ainsi sur le maltose, le lactose. De même des zooglées qui respiraient mal ont vu s'augmenter leur consommation d'oxygène: arabinose, xylose, saccharose, galactose... Sur les alcools, l'action est généralement nulle ou presque.

§ 3. — Mesure du potentiel limite d'oxydo-réduction
de *B. xylinum* en anaérobiose.

La mesure du potentiel d'oxydo-réduction de *B. xylinum*, a été effectuée à pH 7, par la méthode des indicateurs colorés. Nous avons déterminé le potentiel limite, qui est défini par le colorant le plus négatif susceptible d'être réduit au bout d'un temps pratiquement infini.

Nous avons opéré dans des tubes de Thunberg, dans lesquels nous introduisions un quart de zooglée fraîche, soit environ 50 mg de zooglée sèche, 3 cc³ de solution (à 4 %) et quelques gouttes de l'indicateur à étudier. Dans chaque tube nous faisons le vide pendant 10 à 15 minutes, puis les tubes bien fermés, étaient déposés à l'étuve à 25° ou agités dans le thermostat (à 25° également). Nous avons employé des solutions tamponnées au citrate et au phosphate, mais après avoir constaté que les tampons influaient sur les résultats, (ils étaient plus ou moins activés par la bactérie) nous avons purement et simplement supprimé le tampon et employé de l'eau ordinaire.

La substance activante dissoute à raison de 4 % était du glucose, du glycérol ou de l'alcool éthylique. Les lectures ont été faites après 18 heures. La concentration en colorant était 100 mgr par litre.

Le rouge neutre n'est pas décoloré, ce qui est dans la norme, puisqu'à pH 7,2 il n'est décoloré qu'à un potentiel de l'ordre de — 0, v500, soit vers $rH^2 = -3$ qui ne se rencontre pas dans les organismes.

Le vert janus vire au violet, au rouge, puis au jaune.

La phénosafranine n'est pas décolorée.

Le violet de crésyl est assez lentement décoloré.

Le bleu de Nil, les sulfonates d'indigo, le bleu de méthylène, le bleu de crésyl, le violet de Lauth ou thionine, sont facilement décolorés.

Or, à pH 7, le potentiel d'oxydo-réduction du violet de crésyl est de —167 millivolts et celui du bleu de Nil — 142 millivolts, il faut donc que le potentiel du colorant soit supérieur à —150 millivolts. De plus les rH^2 correspondant au bleu de Nil et au violet de crésyl

étant respectivement 9,2 et 8,3, nous pouvons considérer le rH^2 de *B. xylinum* comme voisin de 8.

Semi-anaérobiose.

D'après COHEN, CHAMBERS et REZNIKOFF (1928) certaines amibes ont la propriété de réduire en aérobie tous les indicateurs réversibles dont rH^2 est compris entre 13 et 18 cependant qu'en anaérobiose elles atteignent un rH^2 inférieur à 7,6.

Nous avons de même pu constater que le potentiel d'oxydo-réduction de *B. xylinum* descend plus bas en anaérobiose qu'en semi-anaérobiose.

Cette semi-anaérobiose était réalisée de la façon suivante : nous introduisons un hachis de zooglée (correspondant à 50 mg de zooglée sèche) dans de gros tubes à essai d'environ 20 cm de haut et d'une capacité voisine de 60 cc³ ; nous ajoutons 30 cc³ de solution (eau ordinaire ou autolysat de levure à 4 % de substance activante et, après stérilisation, la quantité de colorant nécessaire pour amener la concentration en colorant à 200 mgr. pour 1.000 cc³

Dans ces conditions, et quelle que soit la substance active, le potentiel limite est voisin de —125 millivolts.

§ 4. — Vitesse d'oxydo-réduction.

Nous avons étudié la vitesse de réduction de la thionine, du bleu de crésyl, du bleu de méthylène, de l'indigo disulfonate de potassium pour toute une série de substances.

D'une manière générale les substances activées sont celles qui permettent la croissance de *B. xylinum*, les mêmes qui sont favorables à la respiration et que nous avons classées dans les « aliments ». Ainsi ni le glycol ni ses dérivés, sauf l'acétate d'éthyl-glycol, ne sont activés par *B. xylinum*.

Nous avons remarqué d'autre part que l'eau citratée ou phosphatée additionnée de thionine est décolorée par *B. xylinum*, il semble bien que le citrate et surtout le phosphate soient activés par cette bactérie. L'autolysat de levure seul est décoloré plus vite que la plupart des solutions d'autolysat additionnées d'un aliment hydro-carboné, cependant que l'eau ordinaire ne l'est pas du tout.

En conséquence nous avons étudié la décoloration des substances dissoutes dans l'eau ordinaire, et nous avons trouvé entre elles des

différences bien plus marquées qu'avec l'autolysat de levure comme substrat.

La vitesse de décoloration n'est proportionnelle ni à la concentration de la solution, ni à la quantité de zoogée ; de plus, cependant qu'un lavage très prolongé diminue la consommation d'oxygène, il n'a presque aucune influence sur la vitesse d'oxydo-réduction.

a) *en anaérobie*. — Pour les corps « activés » les vitesses de décoloration sont peu différentes en anaérobie. Ainsi le glycérol, le glucose, le saccharose ont des vitesses de décoloration très voisines, toutes les courbes de vitesse sont superposables.

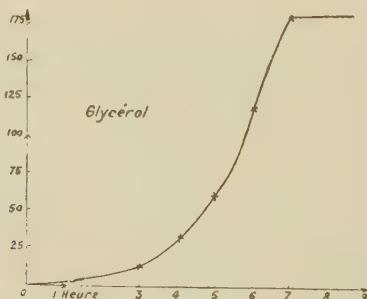
DÉCOLORATION D'UNE SOLUTION DE GLUCOSE à 4/100
ADDITIONNÉE DE THIONINE,
(vide fait au préalable à la pompe à huile)

Concentration de la solution de thionine décolorées en

4	mg.	par	litre		3	heures
12	—	—	—		4	—
20	—	—	—		5	—
40	—	—	—		7	—
60	—	—	—		9	—

Soit :

0,012	mg.	décolorés en	3	heures	par	50	mg.	de	zoogée	(exprimée en poids sec)
0,036	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—
0,060	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—
0,120	—	—	7	—	—	—	—	—	—	—
0,180	—	—	9	—	—	—	—	—	—	—



Courbe exprimant la décoloration de la thionine en fonction du temps

b) *en semi-anaérobie*. — En semi-anaérobie, les vitesses de décoloration sont bien plus différentes qu'en aérobie.

La surface de séparation de la partie décolorée est très nette pour les polyalcools, le saccharose, les alcools ; de plus la décoloration est parfaite, pour tous ces corps les tubes sont violets et blancs.

Tous les oses, sauf le saccharose, présentent une surface ambiguë de décoloration, laquelle passe du violet au jaune par le mauve, le bleu et le vert.

Tableau 18.

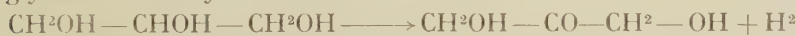
VITESSES DE RÉDUCTION D'UNE SUSPENSION DE *B. XYLINUM*
DANS L'EAU ORDINAIRE ADDITIONNÉE DE DIVERS ALIMENTS
en semi-anaérobiose.

MM. DE THIONINE à 200 MG PAR LITRE DÉCOLORÉS APRÈS	18 HEURES	24 HEURES	48 HEURES
Glycérol	16	18	100
Mannitol.	13	13	100
Sorbitol.	20	22	50
Dulcitol.	0	0	0
Glucose.	18	20	55
Mannose	20	25	55
Lévilose.	22	25	55
Saccharose	0	0	18
Maltose.	12	12	16
Arabinose.	30	85	90
Alcool méthylique	0	0	5
Alcool éthylique	0	0	16

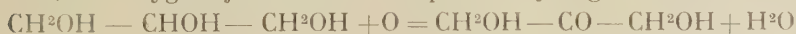
§ 5. — Croissance anaérobie de *B. Xylinum* Milieux permettant la croissance.

« Si, disent Hugo HAEHN et Margot ENGEL, on prive *B. xylinum* d'air en remplissant le flacon jusqu'en haut, il ne pousse pas » (1929). Aucun auteur n'a signalé la croissance de *B. xylinum* en anaérobiose, même aucune autre tentative n'a été tentée. NEUBERG et WINDISCH (1925) l'utilisent en anaérobiose mais simplement comme réactif chimique, et, si la bactérie ne « pousse » pas sans air, elle ne meurt pas non plus immédiatement par privation d'oxygène.

Cependant la présence d'air ou plus exactement d'oxygène est-elle indispensable ? Soit la tranformation par la bactérie de glycérine en dioxyacétone :



c'est bien une oxydation, mais une oxydation par déshydrogénation, où l'oxygène joue le rôle d'accepteur d'hydrogène :



Si l'oxygène sert uniquement à maintenir le potentiel d'oxydo-réducteur à un niveau constant, il doit être possible de le remplacer par un autre accepteur d'hydrogène, par exemple par les divers colorants vitaux.

Pour vérifier l'exactitude de cette hypothèse, nous avons fait plusieurs séries d'expériences en additionnant de colorants des tubes d'autolysat de levure glycérolés. Nous avons employé les quantités de colorants que nous avons reconnu favorisant ou au moins non toxiques en aérobiose. Comme d'habitude les colorants furent introduits après stérilisation des milieux, et tous les tubes ensemencés dans des conditions identiques par quelques gouttes d'une dissolution au 1/100 d'une culture jeune. Le vide a été fait dans chaque tube pendant plus de 15 minutes et nous les avons fermés sous le vide. Nous pouvons donc admettre qu'ils étaient aussi exempts d'air que possible.

Les témoins à l'air ont tous bien poussé, les témoins dans le vide (c'est-à-dire les tubes ne contenant pas d'accepteur d'hydrogène) n'ont pas donné lieu à la moindre croissance, sauf un qui a poussé un tout petit peu, mais le flocon était vraiment minuscule et dû sans doute aux traces d'oxygène demeurées dans le liquide.

Les tubes additionnés de colorants ont tous poussé. Pendant les six premiers jours ils se sont développés normalement, puis, les colorants entièrement utilisés, ils ont cessé toute croissance.

Les tubes à la thionine se sont tous mieux développés que les tubes correspondants au bleu de crésyl et tous ont montré un maximum très net pour la concentration de 200 mg par litre. Pour cette concentration les volumes des zooglées à la thionine ont été pendant les six premiers jours bien plus forts que celui des zooglées à l'air (sans colorant) c'est la répétition du phénomène déjà noté en aérobiose et qui s'explique encore mieux ici : une fois tout le colorant utilisé la zooglée ne pousse plus.

La même expérience a été faite en employant au lieu d'autolysat de levure, le milieu de TARR et H. HIBBERT, ou l'eau ordinaire additionnée d'aliment. Mais cette fois au lieu d'ensemencer de la manière habituelle par quelques gouttes d'une dilution d'une culture jeune, nous avons introduit dans chaque tube un hachis de 50 mg (1)

(1) Poids séé.

de zooglée bien lavée. Toutes les autres conditions de l'expérience étaient les mêmes. Dès le lendemain les tubes étaient pâlis et, après deux ou trois jours, ils étaient non seulement complètement décolorés, mais parfaitement solides ; la zooglée a très bien poussé dans les tubes contenant de 200 à 400 mg par litre, cependant que dans les témoins les morceaux de zooglée restent toujours isolés les uns des autres même après 3 mois à 25°.

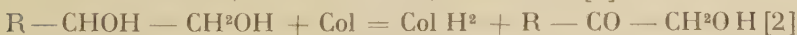
Après ce laps de temps, nous avons sacrifié trois des tubes parmi ceux qui ne contenaient qu'une petite zooglée : nous avons brisé la pointe sous l'eau, aussitôt l'eau a rempli le tube et la solution a repris quantitativement sa couleur initiale, mauve foncé pour la thionine, bleu pour le bleu de crésyl, ce qui prouve que le colorant a bien été utilisé pour la croissance de la bactérie. Nous croyons pouvoir conclure de cette expérience la possibilité de faire pousser *B. xylinum* en anaérobiose, en lui fournissant un accepteur approprié d'hydrogène, sur le glycérol ou sur un quelconque polyalcool oxydable en aérobiose. Les plus belles zoogléas que nous ayons obtenues mesuraient 1 à 2 cm² et pesaient sèches 1 à 5 mg. Si l'on pouvait ajouter du colorant au cours de l'expérience on pourrait sans doute obtenir une croissance qui dure plus de 10 jours et des zoogléas qui rempliraient tous les tubes comme en aérobiose.

Nous avons essayé de cultiver dans les mêmes conditions *B. xylinum* sur l'alcool éthylique et sur le glucose.

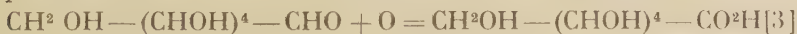
Nos expériences sur l'alcool éthylique ont été pleinement couronnées de succès et les résultats identiques à ceux que nous avons déjà obtenus sur le glycérol, mais, nous n'avons jamais réussi à faire pousser la bactérie en anaérobiose sur le glucose.

Le fait remarquable qui se dégage de ces expériences est le suivant :

Toutes les fois que la bactérie se trouve sur un substrat auquel elle se contente de soustraire de l'hydrogène, elle croît en anaérobiose aux dépens d'une réaction de réduction :



Lorsque la bactérie se trouve sur un substrat qu'elle oxyde par fixation d'oxygène, comme les aldoses transformées en acide correspondant :



la croissance anaérobie en présence de colorants se révèle impossible. Même si l'on ensemence en masse, en introduisant des fragments des zoogée, la croissance est nulle.

WURMSER (1923) soutient que l'oxygène ne peut être remplacé par des colorants en anaérobiose quand : « l'oxygène participe à des réactions liées aux synthèses ». Le cas de *B. xylinum* rentre sans doute dans la catégorie des réactions indiquées par WURMSER.

La célèbre expérience de WIELAND relative à la préparation d'acide acétique par action de *B. aceti* Hansen sur l'alcool éthylique en anaérobiose est différente de notre expérience puisque WIELAND utilisait des bactéries séchées. C'était donc dans ce cas plutôt une action chimique, cependant que notre travail est relatif à un *développement*.

KLUYVER (1931) dit que, dans toutes les oxydations d'*Acetobacter suboxydans*, bactérie très voisine de *B. xylinum*, l'oxygène peut être remplacé par d'autres accepteurs d'hydrogène tel que le bleu de méthylène. Nous croyons qu'il s'agit d'expériences chimiques analogues à celles de WIELAND, ce qui a permis à KLUYVER de réaliser l'oxydation du glucose en acide gluconique en anaérobiose, fait que nous avons vu impossible à réaliser par la *croissance* de *B. xylinum* en anaérobiose, conformément à la théorie de WURMSER.

§ 6. — Signification des résultats.

Il importe de rechercher ce que signifie :

1° — La valeur du potentiel d'oxydo-réduction trouvé.

2° — La croissance bactérienne en anaérobiose.

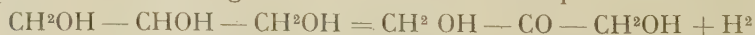
1° — Le potentiel d'oxydoréduction trouvé, coïncide au degré près d'approximation des expériences, avec :

a) le potentiel limite du glucose en anaérobiose (R. WURMSER).

b) le potentiel d'équilibre acide pyruvique-acide lactique.

c) le potentiel limite de la plupart des cellules végétales en anaérobiose.

Pour donner une interprétation précise du phénomène, il faudrait connaître l'énergie libre des réactions telles que :



Cette énergie libre n'a pas été mesurée ; on connaît seulement, d'après les tables thermochimiques la différence des chaleurs de

combustion des deux systèmes : glycérol (397 calories) et dioxyacétone + hydrogène ($343 + 69 = 412$ calories) soit 15 calories. Or le rH^2 trouvé, de 8 environ, correspond à une énergie libre de 11,6 calories.

La concordance ne peut être bonne, puisqu'il y a généralement une notable différence entre énergie libre et chaleur de réaction ; ainsi dans l'oxydation de la fonction secondaire de l'acide lactique en fonction cétone (acide pyruvique), la chaleur de réaction est de 20 calories, l'énergie libre est de 11,6 calories, pratiquement égale à l'énergie libre du passage de la fonction alcool secondaire du glycérol à la fonction cétone correspondante, d'après les mesures de rH^2 faites avec *B. xylinum*.

Le potentiel d'oxydoréduction de *B. xylinum* sur un alcool secondaire représenterait donc le potentiel du passage de la fonction alcool secondaire à la fonction cétone. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant le potentiel d'oxydation de diverses bactéries, ou préparations oxydantes cétoènes sur le glycérol.

2° — Le fait étant établi, la seule question qui se pose est celle-ci : la réduction des colorants de $rH^2 > 8$ est-elle une forme de la respiration ou un phénomène indépendant ?

Cette question se ramène expérimentalement à la suivante : consommation d'oxygène et réduction sont-ils des phénomènes du même ordre de grandeur ?

Les deux phénomènes peuvent-ils être séparés ?

L'expérience montre que la vitesse de consommation d'oxygène est cinquante fois plus grande que la vitesse de réduction. Voici quelques chiffres : l'oxygène est exprimé en mm^3 pour 25 mg. de zooglée sèche par heure ; le colorant réduit, mesuré d'après la méthode des tubes de THUNBERG est exprimé également en mm^3

CORPS ÉTUDIÉS	O ² CONSOMMÉ	THIONINE RÉDUITE EN ANAÉROBIOSE
Glycérol	40	0,7
Erythritol	21	0,4
Mannitol.....	25	0,4
Alcool éthylique	29	0,6
— propylique	19	0,6
Milieu minéral	10	0,2

pour 25 mg. de zooglee sèche par heure, une molécule de colorant correspondant à $2,24 \times 10^7$ mm³. Le pH dans tous les cas est égal à 7.

Les deux phénomènes peuvent d'autre part être séparés dans les cas suivants :

a) comme nous verrons chapitre VII, KCN à la concentration N/100 augmente 5 à 10 fois la vitesse de consommation d'oxygène effet inverse de l'effet habituel de ce corps. Il ne modifie pas sensiblement la vitesse de réduction (KCN N/10 la réduit de moitié).

b) les zooglees longuement lavées dans un courant d'eau perdent plus des 3/4 de leur intensité respiratoire ; elles réduisent toujours avec la même vitesse.

c) Les esters de l'acide bromacétique tuent les zooglees : la croissance est empêchée à la concentration N/10.000, la respiration à N/1.000, la réduction seulement à N/100. (Chapitre VI).

Malgré l'indépendance des deux phénomènes la bactérie peut donc vivre et croître en anaérobiose. La croissance peut se produire aux dépens de réactions productrices d'énergies très diverses, aérobies ou anaérobies.

CHAPITRE VI

ACTIONS DE QUELQUES INHIBITEURS SUR LA CROISSANCE, LA RESPIRATION ET LE POUVOIR OXYDORÉDUCTEUR DE *BACTERIUM XYLINUM*

- § 1. Introduction.
- § 2. Action sur la croissance,
- § 3. Action sur le respiration.
- § 4. Action sur le pouvoir oxydoréducteur.

§ 1. — Introduction.

L. GENEVOIS et ses collaborateurs P. CAYROL, H. QUÉRÉ, T. NICOLAIEFF et A. RADOËFF, ont découvert une action toxique considérable des esters de l'acide bromacétique sur les microorganismes ; les esters chloracétiques sont dix fois moins actifs. Les isosulfocyanates d'allyle et de phényle ont la même action, surtout sur les bactéries acétiques (H. QUÉRÉ. *Bacterium pasteurianum* Bx.) Ces corps ont ceci d'intéressant, qu'ils constituent des antiseptiques inoffensifs pour l'homme et les mammifères, que ce soit par ingestion ou par injection (L. GENEVOIS, J. BRISOU, H. QUÉRÉ). Nous avons pu étendre ces résultats à *B. xylinum* : la croissance de cette bactérie cétogène est arrêtée par des concentrations très faibles, de l'ordre de N/10.000 de bromacétate, quel que soit le poids moléculaire de l'alcool estérifiant l'acide bromacétique : cette action est semblable à celle observée sur les bactéries acétiques par H. QUÉRÉ. Il y a donc ici une action pharmacologique remarquablement générale.

L'inhibition de la respiration a de même été étudiée d'une

manière générale par L. GENEVOIS et ses collaborateurs. H. QUÉRÉ travaillant comme nous-même sur une bactérie acétique (*B. Br*) a trouvé que l'inhibition de la croissance est déjà complète lorsque l'inhibition de la respiration n'est encore qu'à peine sensible ou qu'elle est pratiquement nulle.

C'est J. H. QUASTEL et WOOLDRIDGE (1927) qui ont les premiers étudié l'inhibition du pouvoir oxydoréducteur des bactéries. QUASTEL et ses collaborateurs ont surtout travaillé avec *B. coli* et *B. alcaligenes* et ont trouvé que les divers inhibiteurs ont des actions différentes sur une même réaction. C'est de ces résultats que QUASTEL a déduit sa théorie de « l'activation ».

§ 2. — Action sur la croissance.

Les cultures ont toutes été effectuées sur un autolysat de levure à 5 g. ‰ d'extrait sec et le glycérol à 4 ‰ , était la source de carbone.

Nous avons étudié l'action de l'acide bromacétique, des bromacétates de benzyle et d'éthylglycol, des chloracétates de benzyle et d'éthylglycol, des isosulfocyanates d'allyle et de phényle, de l'iodyacétone et du cyanure de potassium.

Les résultats obtenus avec les neuf premières substances sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Dans toutes nos expériences nous avons conservé plusieurs témoins sans inhibiteur. Nous avons examiné avec un soin tout particulier, l'action du cyanure de potassium sur la croissance de *B. xylinum* en raison de son influence extraordinaire sur la respiration de cette bactérie, influence que nous verrons plus loin au chapitre VII.

CONCENTRATIONS LIMITES EMPÊCHANT LA CROISSANCE DE *BACTERIUM XYLINUM* ;

Acide bromacétique	N/4.000
Bromacétate de benzyle	N/10.000
Bromacétate d'éthylglycol.	N/10.000
Chloracétate de benzyle	N/500
Chloracétate d'éthylglycol	N/500
Isosulfocyanate d'allyle	N/2.000
Isosulfocyanate de phényle	N/10.000
Iodyacétone.	N/10.000

Les bromacétates et l'isosulfocyanate de phényle ainsi que l'iodyacétone sont les plus actifs. *B. xylinum* résiste bien à l'acide

bromacétique, encore mieux à l'isosulfocyanate d'allyle et surtout aux chloracétates.

§ 3. — Sur la respiration.

a) Action de l'acide bromacétique à la concentration N/100.

L'acide bromacétique même à une concentration élevée, n'a aucune action sur la respiration de *B. xylinum*. La concentration maximum employée, N/100, modifie déjà sensiblement le pH qu'elle fait passer de 6,5 à 5 environ. Une concentration plus élevée en acide bromacétique ne pourrait donner d'indication sur la valeur inhibitrice de ce composé, car elle modifierait trop le pH. L'expérience a duré une heure après l'addition d'acide bromacétique.

Tableau 19.

ACTION DE L'ACIDE BROMACÉTIQUE A LA CONCENTRATION N/100

Concentration en aliment : 4 %.

100 Io² à T = 25°

Tampon acide citrique et soude.

Age des zooglées : 13 jours

pH	DATES DES EXPÉRIENCES			
	9/12/32		12/12/32	
	6,2		6,5	
ALIMENT	Avant	Après 1 h.	Avant	Après 1 h.
Témoin	52,4	52,4	48,4	48,4
Alcool méthylique.....	74,2	72,4	57,6	57,6
— éthylique	232,8	232,8	159,6	159,6
— propylique	144	144	72,6	72,6
— butylique	26,4	26,4	22,4	22,4
— amylique	22,8	22,8	12,8	12,8

b) Action de bromacétates d'éthylglycol et de benzyl.

Les bromacétates d'éthylglycol et de benzyl à la concentration N/10⁴ n'ont absolument aucune action sur la respiration de *B. xylinum*. Tant sur le témoin que sur le glucose, le glycérol ou les différents alcools, la consommation d'oxygène n'est en rien modifiée par l'addition des deux bromacétates à la concentration N/10⁴, même après deux heures d'action. Cependant une concentration plus élevée

est néfaste à la bactérie : la concentration $N/10^3$ est suffisante pour arrêter aussitôt et complètement la respiration de *B. xylinum*, aussi bien sur milieu sans aliment que sur milieu glycérolé.

c) *Action des chloracétates d'éthylglycol et de benzyl.*

Les chloracétates ont une action encore plus faible que les bromacétates et il faut atteindre la concentration $N/40$ pour obtenir l'inhibition de la respiration de *B. xylinum*, inhibition qui n'est même complète qu'après une heure d'action.

Les résultats sont les mêmes sur milieu sans aliment et sur milieu glycérolé.

d) *Action de l'iodacétone et de l'aldéhyde isovalérianique.*

L'iodacétone à la concentration $N/2.000$ et l'aldéhyde isovalérianique à la concentration $N/100$, inhibent complètement la respiration de *B. xylinum* quel que soit le milieu.

c) *Action des isosulfocyanates d'allyle et de phényle.*

Les isosulfocyanates d'allyle et de phényle ont des actions très différentes sur la consommation d'oxygène de *B. xylinum*. A $N/1.000$ et à $N/2.000$ l'isosulfocyanate de phényle inhibe à peu près complètement la respiration ; cependant qu'à $N/400$, l'isosulfocyanate d'allyle la diminue seulement et qu'il faut aller jusqu'à $N/250$ pour obtenir une inhibition complète.

Les résultats sont les mêmes sur milieu sans aliment et sur milieu glycérolé.

Les inhibiteurs sont d'une manière générale bien plus actifs sur la croissance que sur la respiration. (tableau 21).

Ainsi l'acide bromacétique qui n'a aucune action à $N/10^2$ sur la respiration, empêche la croissance déjà à la concentration $N/4 \times 10^3$.

De même les bromacétates d'éthyl-glycol et de benzyl qui n'inhibent la respiration qu'à $N/10^3$ arrêtent la croissance à $N/10^4$.

Les chloracétates doivent être employés à $N/40$ pour inhiber la respiration, la croissance ne peut se poursuivre en présence de $N/500$.

Nous avons vu que les isosulfocyanates de phényle et d'allyle se comportaient différemment sur la respiration, celui-ci étant moins actif que celui-là, le même phénomène se produit sur la croissance puisque l'isosulfocyanate de phényle empêche la croissance à $N/10^4$.

alors qu'il faut employer le dérivé allylé à la concentration $N/2 \times 10^3$ pour aboutir au même résultat.

L'iodacétone arrête la respiration à $N/2 \times 10^3$ et la croissance à $N/10^3$.

Tableau 20.

ACTION DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS

Concentration en aliment : 4 %

100 Io^2 à $T = 25^\circ$

Tampon acide citrique et soude.

pH 6,5

Age des zooglées : 15 jours.

INHIBITEURS	DATES DES EXPÉRIENCES			
	29/3/33		30/3/33	
	SANS ALIMENT		GLYCÉROL	
	Avant	Après	Avant	Après
A. Br. Benzyle.		15'		15'
N/1.000.....	40	0	184	0
A. Br. éthylglycol.		15'		15'
N/1.000.....	40	0	172	0
A. Br. Benzyle.		2 h.		2 h.
N/10.000.....	44	44	180	180
A. Br. éthylglycol.		2 h.		2 h.
N/10.000.....	43	43	174	174
A. Cl. Benzyle.		1 h.		1 h.
N/40.....	40	0	179	0
A. Cl. éthylglycol.		1 h.		1 h.
N/40.....	40	0	172	0
Iodacétone.		15'		15'
N/2.000.....	44,8	0	182	0
Aldéhyde isovalérianique.		15'		15'
N/1.000.....	44,	0	180	0

§ 4. - Inhibition du pouvoir oxydo-réducteur de *Bacterium xylinum*.

L'acide bromacétique à $N/100$ empêche la réduction de la thionine, il retarde déjà à $N/1.000$, mais n'a presque aucune action à $N/10.000$.

Le bromacétate de benzyle n'a pas d'action à $N/5.000$ et très peu à $N/500$, mais à $N/100$ il inhibe presque complètement la

réaction. De même le bromacétate d'éthyl-glycol n'est actif ni à N/10.000, ni à N/1.000, et son pouvoir inhibiteur est un peu plus faible pour N/100 que celui du bromacétate de benzyle.

Les chloracétates sont encore moins puissants : le chloracétate de benzyle à N/400 n'a aucune action, il retarde nettement à N/40, mais il faut employer la concentration de N/4 pour obtenir une inhibition parfaite. Pour cette même concentration le chloracétate d'éthyl-glycol n'a qu'une action retardatrice.

L'isosulfocyanate d'allyle à N/1.000 retarde très notablement la réduction, mais l'isosulfocyanate de phényle est plus actif, puisque à N/10.000 il l'empêche complètement.

L'iodacétone à N/1.000 est un inhibiteur partiel, à N/100 il ne permet plus aucune réduction.

En somme les inhibiteurs sont d'une manière générale, plus actifs sur la croissance que sur le pouvoir oxydo-réducteur et plus sur celui-ci que sur la respiration, comme l'indique le tableau ci-dessous.

Nous avons voulu voir si les inhibiteurs ont des actions différentes sur les divers colorants et sur les différents aliments. Nous avons trouvé pour la thionine, le bleu de méthylène, le bleu de créosyl et le potassium indigo disulfonate des résultats identiques. De même l'inhibition du pouvoir-réducteur sur glycérol, sur glucose, sur saccharose et sur alcool éthylique a donné exactement les mêmes résultats.

Tableau 21.

ACTION COMPARÉE DE DIVERS INHIBITEURS
sur la croissance, la respiration, le pouvoir d'oxydo-réduction.

Acide bromacétique	N/4.000	aucune action même pour N/10 ²	N/100
Bromacétate de benzyle	N/10.000	N/1000	N/100
Bromacétate d'éthyl-glycol	N/10.000	N/1000	N/100
Chloracétate de benzyle	N/500	N/40	N/400
Chloracétate d'éthyl-glycol.....	N/500	N/40	N/40
Isosulfocyanate d'allyle.....	N/2.000	N/200	N/1.000
Isosulfocyanate de phényle.....	N/10.000	N/10.000	N/5.000
Iodacétone.....	N/10.000	N/2.000	N/1.000
Cyanure de potassium	N/1.000	active	retarde sans empêcher

CHAPITRE VII

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM SUR *BACTERIUM XYLINUM*

- § 1. Introduction.
- § 2. Action sur la croissance.
- § 3. Action sur la respiration .
- § 4. Action sur le potentiel d'oxydoréduction.

§ 1. — Introduction.

Nous avons étudié l'action du cyanure de potassium sur la croissance, la respiration, et le pouvoir oxydoréducteur de *Bacterium xylinum*.

Ajouté à très faible dose ($N/10^3$) au milieu de culture il empêche toute croissance, conformément à la loi générale d'action de ce sel, considéré comme éminemment toxique.

Il n'a au contraire, aucune action nocive sur la respiration de *B. xylinum* : à faibles concentrations ($N/1.000$ et moins) son influence est nulle, aux concentrations élevées ($N/10$ et $N/100$) il excite considérablement (de 5 à 10 fois) la consommation d'oxygène de la bactérie.

Sur l'oxydoréduction son action est faible, il se borne à diminuer à peu près de moitié la vitesse d'oxydoréduction.

Ce n'est pas la première fois que l'on observe une action nulle du cyanure de potassium à faible concentration sur la respiration d'un être vivant. La découverte de ce phénomène remonte à LUND qui a trouvé en 1918 que le KCN n'a pour ainsi dire pas d'action sur le *Paramecium*. Ch. SHoup et BOYKIN, 1932, ont vérifié les travaux de LUND et ils ont même trouvé que le cyanure de potassium à

des concentrations variant de 0,005 à 0,0001 M augmente légèrement la consommation d'oxygène de *Paramecium*.

WARBURG, 1919, EMERSON, 1927, L. GENEVOIS, 1928, WATANABE, 1932, ont trouvé que KCN augmentait la respiration de *Chlorella* en milieu minéral, mais en milieu minéral seulement et d'autre part dans une assez faible proportion.

On sait que l'enzyme dite de SCHARDINGER (1) n'est pas affectée par des concentrations de cyanure inférieures à 0,01 M, de même WARBURG et CHRISTIAN ont isolé dernièrement (1932), une telle enzyme de la levure basse.

Cependant les excitations dues au cyanure de potassium examinées jusqu'à présent sont relativement faibles, environ 50 %. SMYTHE (1932 et 1933) a trouvé une augmentation de consommation d'oxygène par KCN comparable à celle que nous avons nous-même obtenue, mais dans un milieu chimique.

Il additionne une solution de méthylglyoxal (0,130 M) de solutions relativement peu concentrées de KCN (0,0005 M) et voit le dégagement de CO² passer par exemple de 2,9 à 109 cc³. Ce phénomène a lieu en absence de bactéries et le cyanure de potassium se conduit comme un véritable catalyseur d'oxydation. Nous avons pensé que l'augmentation considérable de consommation d'oxygène que nous avons nous-même constatée était peut-être due à la présence de dioxycétone dans la zooglye de *B. xylinum*, la bactérie ayant poussé sur glycérol ; nous avons étudié le phénomène sur la dioxycétone pure et sur des zooglyes de plus en plus lavées.

En l'absence de bactéries, la dioxycétone à 4 % voit sa consommation d'oxygène élevée par addition de cyanure de potassium, mais d'autre part des zooglyes absolument débarrassées de toute trace de dioxycétone voient également KCN augmenter leur consommation d'oxygène, cependant que ce sel est sans action sur des zooglyes mortes (ébouillantées). Il semble donc que les deux phénomènes soient distincts, le second est-il dû à la présence dans la

(1) SCHARDINGER a découvert cette enzyme en 1901 dans le lait frais, mais il semble bien qu'il n'ait fait que répéter une expérience peu connue de E. DUCLAUX (*Traité de microbiologie*, 1883) dans laquelle ce savant montre la décoloration du carmin d'indigo par le lait frais et sa recoloration par agitation à l'air. C'est en somme la toute première réaction d'oxydoréduction connue. E. DUCLAUX l'attribue à l'existence de ferments dans le liquide.

molécule vivante de certain composé oxydable sous l'influence du cyanure de potassium ?

Nous verrons § 3 l'étude détaillée de l'action de KCN sur *B. xylinum* et quelles conclusions nous croyons pouvoir en tirer.

§ 2. — Action sur la croissance.

Le milieu de culture utilisé pour l'étude de l'action du cyanure de potassium sur la croissance de *B. xylinum* est le milieu habituel : autolysat de levure à 5 g. o/oo d'extrait sec, plus 40 gr. par litre de glycérol.

Les concentrations de cyanure de potassium employées s'échelonnaient de N/10 à N/10⁶ par puissance de 10. Les concentrations N/10, N/10², N/10³ empêchent toute croissance, cependant, que pour N/10⁴, N/10⁵, N/10⁶ la croissance n'est même pas ralentie. Dans une série d'expériences complémentaires nous avons déterminé de plus près la concentration de cyanure mortelle en resserrant l'intervalle, N/1.000 - N/10.000. A N/5.000, *B. xylinum* pousse normalement, à N/2.500 la bactérie pousse à peine. Nous pouvons donc considérer N/1.000 comme la concentration mortelle de cyanure de potassium pour *B. xylinum*.

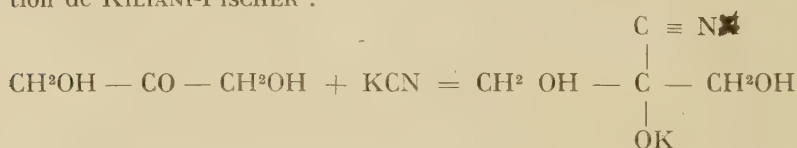
Nous avons constaté d'autre part, que, pour N/10.000 les cultures sont bien plus belles que les cultures témoins (sans addition de KCN) et ce phénomène s'est renouvelé régulièrement. N/10.000 est donc la dose optimum de KCN pour *B. xylinum*.

C'est SCHULZ qui a le premier (1885-1888) attiré l'attention sur l'existence de doses optima pour chaque antiseptique. Il a vu que les poisons de la levure accélèrent la fermentation lorsqu'ils interviennent à faible dose, cette dose pouvant être exactement déterminée, et que la dose accélérante a un certain optimum. SCHULZ a même observé des cas où la présence de l'antiseptique est sans action. SCHULZ a rapproché ses résultats de ceux de Claude BERNARD sur les poisons de l'organisme. Ultérieurement, BIERNACKI, 1891, a étudié avec soin les doses mortelles et optima de toute une série d'antiseptiques sur la fermentation de la levure et a établi une loi suivant laquelle la dose mortelle d'un antiseptique est à peu près proportionnelle à la quantité de levure, et que d'autre part, la quantité de sucre ne joue aucun rôle sensible.

§ 3. — Action du cyanure de potassium sur la respiration.

Nous avons vu que SMYTHE (1932) a découvert une véritable action catalytique du cyanure de potassium sur l'oxydation du méthylglyoxal : la consommation d'oxygène est augmentée considérablement par le cyanure. Nous avons constaté le même phénomène sur une solution de dioxycétone à 4% (tableau 22) pour laquelle, sous l'influence du cyanure de potassium, la consommation d'oxygène passe brusquement de 1 mm³ en 15 minutes à 68 mm³ pendant le même laps de temps. C'est une réaction explosive : après 45 minutes la quantité d'oxygène consommée en 15 minutes tombe à 17 mm³ et s'y maintient pendant 2 heures.

On sait d'autre part que le cyanure de potassium forme un nitrile (ou plus exactement deux nitriles stéréoisomères) avec la dioxycétone, comme avec tous les aldoses et cétooses, selon la réaction de KILIANI-FISCHER :



Si l'on ajoute du cyanure à une solution de dioxycétone à 4 % de manière à obtenir une solution N/10 de cyanure, le cyanure se combine peu à peu à la dioxycétone, comme l'indique le dosage du cyanure effectué de 15 en 15 minutes, la disparition se fait rapidement d'abord ; moins vite ensuite, en 4 heures tout le cyanure a disparu. (expérience faite sur 20 cc³).

Les deux phénomènes : catalyse de l'oxydation de la dioxycétone, formation d'un nitrile semblent coexister. Le second expliquant la disparition du cyanure, le premier l'augmentation de la consommation d'oxygène.

Nous avons cherché à savoir si l'augmentation de la consommation d'oxygène par les zooglées de *B. xylinum* était uniquement due à la présence de dioxycétone (la bactérie ayant poussé sur glycérol, il y a de la dioxycétone dans le milieu de culture) et dans ce but nous avons mesuré l'oxygène consommé par des zooglées de plus en plus lavées. Il ressort du tableau 24 que plus la zooglée est lavée et plus le phénomène est court.

Les zooglées dites « peu lavées » sont lavées comme des zooglées

ordinaires, c'est-à-dire jusqu'à ce que les eaux de lavage n'entraînent plus de dioxyacétone, mais les zooglées elles-mêmes donnent encore la réaction. Les zooglées « très lavées » ne donnent qu'une très faible réaction, quant aux zooglées « parfaitement lavées » elles ne contiennent absolument aucune trace de dioxyacétone.

Il semble bien, d'après le tableau 22, que KCN augmente séparément et simultanément la consommation d'oxygène de la zooglée et de la dioxyacétone. Dans le cas de la zooglée seule le phénomène quoique très prononcé est court : en 30 minutes il est à peu près terminé. Dans le cas de la dioxyacétone seule il est moins violent mais plus long. Les deux excitations semblent pouvoir s'ajouter ou au moins coexister : en effet, les quantités totales d'oxygène consommées en 2 heures 15 par les trois premières zooglées, 524 mm³, 443 mm³, 406 mm³, sont peu éloignées de la somme des deux autres : 233 + 238 = 471 mm³.

Tableau 22

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION N/10 SUR DES ZOUGLÉES PLUS OU MOINS LAVÉES
ET SUR LA DIOXYACÉTONE PURE
Consommation d'oxygène en millimètres cubes.

Tampon acide citrique et soude.
Expérience du 28/1/33.
Age de la zooglée : 11 jours.

pH : 6
T° = 25

		ZOUGLÉES									
		PEU LAVÉES		TRÈS LAVÉES		TRÈS LAVÉES		PARFAITEMENT		DIOXYACÉTONE PURE 4 %	
Avant		3,5		3,2		2,7		2,2		1	
		I.	T.	I.	T.	I.	T.	I.	T.	I.	T.
Après	15'	115	115	169	169	101	101	147	147	68	68
—	30'	81	196	98	267	80	181	49	196	23	91
—	45'	69	265	53	320	58	239	6	202	17	108
—	1 h.	69	334	38	358	43	282	5	207	20	128
—	1 h. 15	61	395	24	382	39	321	5	212	20	148
—	1 h. 30	60	455	19	401	25	346	6	218	38	186
—	1 h. 45	27	472	15	416	22	368	5	223	17	201
—	2 h.	26	498	15	431	19	387	5	228	18	221
—	2 h. 15	26	524	12	443	19	406	5	233	18	238

(I) Consommation d'oxygène en mm³ pour 15 minutes.

(T) Consommation totale d'oxygène en mm³ de 15 en 15'

Il est évident que la concentration en dioxyacétone dans les trois suspensions bactériennes considérées est cependant bien inférieure à 4 %, le poids frais de zoogléas utilisée étant environ 10 mg pour 100 mm³ de solution et la quantité de dioxyacétone ne pouvant même après lavage sommaire dépasser le 1/10 du poids total, la quantité de dioxyacétone est au grand maximum de 1 % dans la première suspension et de 0,1 % dans les deux autres.

Nous avons étudié l'action couplée de dioxyacétone et de cyanure de potassium : à des zoogléas très lavées, complètement débarrassées de toute trace de dioxyacétone, nous avons ajouté :

A) aux unes, d'abord du cyanure de potassium à N/10, puis de la dioxyacétone.

B) aux autres, d'abord de la dioxyacétone puis du cyanure.

L'addition du cyanure de potassium augmente notablement la consommation d'oxygène, l'addition de dioxyacétone l'élève moins, comme l'indiquent les résultats du tableau ci-après :

Tableau 23

ACTION COUPLÉE DU CYANURE DE POTASSIUM ET DE LA DIOXYACÉTONE

Tampon acide citrique et soude.

100 Io² à T = 25°

pH 6

Expérience du 30/1/33

Age de la zoogléa : 13 jours.

	AVANT	+ CYANURE DE POTASSIUM			+ DIOXYACÉTONE	
		APRÈS 15'	APRÈS 30'	+ DIOXY- ACÉTONE APRÈS 15'	APRÈS 15'	+ KCN APRÈS 30'
A	56	1.888	848	1.088		
A	48	2.096	820	1.302		
A	46					
B	32				256	2.096
B	44				128	544

Pour être absolument certain que le phénomène puisse avoir lieu en absence de dioxyacétone, nous avons fait agir le cyanure de potassium sur des zoogléas qui avaient poussé sur glucose, et ne pouvaient contenir par conséquent que du glucose et de l'acide gluconique, il n'y avait certainement pas d'acide oxygluconique, car les zoogléas choisies étaient jeunes (10 jours) et l'on sait que l'acide

gluconique ne s'oxyde qu'après la transformation complète du glucose en acide gluconique (d'autant plus qu'il restait du glucose).

Ces zooglées furent bien et très bien lavées, elles respiraient peu et l'addition de cyanure de potassium a notablement élevé la consommation d'oxygène, comme l'indique le tableau ci-dessous :

Tableau 24

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N/10 SUR MILIEU SANS ALIMENT

Tampon acide citrique et soude 100 Io² à T : 25°
pH 6
Expériences des 10 et 11/2/33
Zooglées âgées de 11 jours.

Avant	Zooglée très bien lavée	A	64
	— bien lavée	B	128
	—	C	160
Après	—	A	544
	—	B	334
	—	C	480

Cette augmentation de la consommation d'oxygène des zooglées de *B. xylinum* est corrélatrice de la vie de la bactérie, en effet des zooglées tuées par ébullition pendant 3 minutes (ne respirant évidemment plus, ou à peine 1 ou 2 mm³ par heure) ne consomment pas davantage d'oxygène par l'addition de KCN.

Les deux phénomènes semblent donc absolument distincts le premier étant lié à la présence dans la molécule vivante d'un composé oxydable sous l'influence de KCN.

Que devient le cyanure de potassium responsable de l'élévation de Io₂ ? Nous savons qu'il forme avec la dioxyacétone un nitrile en C⁴, la disparition du cyanure pour les concentrations utilisées étant à peu près complète en 4 heures. D'autre part une solution de cyanure de potassium abandonnée à l'air et fréquemment agitée ne change guère de titre pendant les premières heures, mais s'oxyde à peu près complètement en 24 heures.

Mais que se passe-t-il dans le cas où le cyanure de potassium est en présence d'une zooglée absolument débarrassée de toute trace de dioxyacétone ? Il disparaît également, mais moitié moins vite que sur la dioxyacétone.

Dans les récipients manométriques, en cours d'expérience, le cyanure disparaît également (tableau 25). Pendant le premier quart d'heure le 1/6 du KCN disparaît, au bout d'une heure 2/6 de KCN ont disparu, au bout de 3 heures 3/6 manquent, soit la moitié du cyanure introduit. Ceci est absolument normal d'après l'action de KCN sur une zoogée entière. Le dosage après 4 heures ne signifie pas grand chose puisque même seul à l'air KCN s'oxyde.

La chute de l'augmentation de la consommation d'oxygène n'est pas due à la diminution de concentration en KCN, puisque l'addition d'une nouvelle quantité de cyanure de potassium ne modifie aucunement la consommation d'oxygène quel que soit le moment auquel on l'effectue : 15 minutes après la première introduction de cyanure, une, deux ou même trois heures après.

Tableau 25.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N/10 SUR MILIEUX SANS ALIMENT

Concentration en aliment : 0

100 Io² à T = 25°

Tampon acide citrique et soude pH : 6

Expérience du 26 /1 /33

Age de la zoogée : 10 jours.

Avant		51,2	48	44	KCN disparu
Après	15'	2.128	1.600	1.440	1/6
	30'	1.712	1.296	1.360	
	45'	1.432	856	1.112	
	1 h.	1.024	696	696	2/6
	1 h. 15	768	576	656	
	1 h. 30	512	384	384	
	1 h. 45	336	432	608	
	2 h.	272	416	608	
	2 h. 15	272	272	432	
	2 h. 30	240	304	480	
	2 h. 45	240	256	288	
	3 h.	240	184	288	3/6
	18 h.	48			

Nous n'avons envisagé jusqu'à présent que des concentrations élevées en KCN : N/10. N/100 a également une action excitatrice sur la consommation d'oxygène par la zoogée de *B. xylum*, mais

Tableau 26.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A DIFFÉRENTES
CONCENTRATIONS SUR MILIEUX SANS ALIMENT.

pH : 6

100 I^o à T = 25

TAMPON ÂGE DES ZOOGLÉES.	DATES DES EXPÉRIENCES								
	11 /1 /33 PHOSPHATE 13 JOURS			25 /1 /33 PHOSPHATE 10 JOURS			16 /12 /32 CITRATE 13 JOURS		
	avant KCN=0	1 ^{re} heure	18 h. après	avant KCN=0	1 ^{re} heure	18 h. après	avant KCN=0	1 ^{re} heure	3 ^e heure
Témoin (KCN= 0)	47	47	40	43	43	43	45	45	45
N/10	44	3080	20	47	1680	28	42	2360	136
N/10 ²	48	600	18	39	720	26	39	840	36
N/10 ³	51	56	26	40	40	39	44	40	40
N/10 ⁴	48	47	50	46	47	44	44	44	41
N/10 ⁵	39	39	35	43	43	40	47	44	44
N/10 ⁶	15	40	44	46	45	43	44	44	42

Tableau 27.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N/10 SUR MILIEUX SANS ALIMENT

Consommation d'oxygène en mm³ pour 25 mg. de zooglée sèche.

Tampon acide citrique et soude.

pH : 6.

Expérience du 26/1/33

Âge de la zooglée : 10 jours.

Avant	Pour 15 minutes			Totale		
	3,2	3	2,7			
Après 15'	133	100	90	133	100	90
— 30'	108	81	85	241	181	175
— 45'	88	66	72	329	247	247
— 1 h.	59	44	56	378	291	303
— 1 h. 15	48	36	41	426	327	344
— 1 h. 30	32	24	24	458	351	368
— 1 h. 45	26	27	38	484	378	406
— 2 h.	17	26	38	501	404	444
— 2 h. 15	10	17	27	518	421	471
— 2 h. 30	15	18	30	533	439	501
— 2 h. 45	15	16	18	548	465	519
— 3 h.	15	16	18	563	482	537
— 18 h.	3					

une action plus faible que KCN N/10 ; les concentrations inférieures n'ont absolument aucun effet, ni au bout d'une heure, ni après 18 heures. (Tableau 26)

Il ressort de plus du tableau 26 qu'en général l'action du cyanure aux concentrations N/10 et N/100 est nulle après 18 heures.

La réaction a une forme explosive, maximum dès l'addition de KCN, elle est à peu près terminée en 3 heures, nulle après 18 heures. (tableau 27) On voit également que les quantités d'oxygène consommées en 3 heures sont peu différentes même quand les expériences étaient au début très différentes.

Tableau 28.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N/10 SUR LES ALCOOLS

Concentration en aliment : 4 %

100 I^o à T = 25°

Tampon acide citrique et soude

Age des zoogléas : 13 jours.

pH	DATES DES EXPÉRIENCES					
	9/12/32			12/12/32		
	6,2			6,5		
	AVANT KCN = 0	1 H. APRÈS	18 H. APRÈS	AVANT KCN = 0	1 H. APRÈS	18 H. APRÈS
ALIMENT						
Témoin (KCN=0)	52	52	52	48	40	40
Alcool méthylque	74	772	142	47	1140	80
— éthylique	232	1096	142	159	1136	138
— propylique	144	2440	144	73	1280	70
— butylique	28	1220	106	22	560	53
— amylique	22	1160	106	12	640	38

O. WARBURG, EMERSON, L. GENEVOIS, WATANABE ont trouvé que KCN augmentait un peu la respiration de la *Chlorella* en milieu minéral, mais en milieu minéral seulement.

Il n'en est pas de même dans le cas de *B. xylinum* ; non seulement l'augmentation est considérable, mais elle n'est pas limitée au milieu minéral et a lieu en présence de n'importe quel aliment ordinaire de la bactérie :

alcool simple, (tableau 28) polyalcool, (tableau 29) ose ou oside (tableau 30). On voit de plus que cette augmentation est pro-

Tableau 29.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N/10 SUR DIVERS ALIMENTSConcentration en aliment : 4 %
Tampon acide citrique et soude100 I_o² à T = 25°

pH. AGE DES ZOOGLÉES	DATES DES EXPÉRIENCES							
	13 /12 /32				26 /1 /33			
	6,2 16 JOURS				6 11 JOURS			
	1 ^{re} HEURE		18 ^e HEURE		1 ^{re} HEURE		18 ^e HEURE	
ALIMENT	KCN = O	KCN N /10	KCN = O	KCN = N /10	KCN = O	KCN = N /10	KCN = O	KCN = N /10
Sans alim...	47	472	10	21	40	480	42	31
Glycérol ..	192	712		96	199	712		48
Erythritol..	102	1124		19	188	804		29
Mannitol ..	112	680			132	680		26
Dulcitol. ...	28	520		28	68	520		20

Tableau 30.

ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM A LA CONCENTRATION
N /10 SUR DIVERS ALIMENTS.Concentration en aliment : 4 %.
Tampon acide citrique et soude.100 I_o² à T = 25°

Ph AGE DE LA ZOOGLÉE	DATE 27 /1 /33 6 13 JOURS	
ALIMENT	KCN = 0 1 ^{re} HEURE	KCN = N /10 1 ^{re} HEURE
Sans aliment.....	40	1.620
Arabinose.....	32	1.680
Glucose.....	156	2.208
Maltose.....	36	1.148
Lactose	28	663

portionnellement la même quelle que soit l'influence du milieu sur la valeur absolue de la consommation d'oxygène en milieu normal (sans KCN). Dans quelques cas l'action excitatrice persiste au delà

de 18 heures, (alcools tableau 28) alors que nous l'avons vue terminée après ce laps de temps dans le cas des milieux sans aliment.

Conclusions.

L'action du KCN sur la consommation d'oxygène par *B. xylinum* ne peut guère être interprétée comme une modification physiologique de la respiration, mais doit, sans aucun doute, être interprétée comme un phénomène chimique d'oxydation catalysée par KCN :

1° — L'augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène n'est pas constante en fonction du temps, Enorme au début elle disparaît au bout de quelques heures. Il y a un « coup de feu » à la consommation d'oxygène.

2° — La quantité totale d'oxygène consommée en surplus dépend de la manière dont la zooglée a été lavée avant l'expérience Elle est d'autant plus grande que la zooglée possède à sa disposition plus de dioxycétone ou un corps analogue.

3° — Des traces de KCN ne suffisent pas ; il faut des concentrations N/10 ou N/100 pour le mettre en évidence.

4° — KCN disparaît au cours du phénomène, sans que l'on puisse mettre en évidence des produits d'oxydation de KCN, ni une relation quantitative de O² consommé et KCN disparu. KCN est consommé en quantité beaucoup plus considérable qu'il n'est consommé d'oxygène : pour 4 à 5 molécules d'oxygène consommées pendant le premier quart d'heure, il y a 35 à 40 molécules de KCN qui disparaissent.

Tout se passe comme s'il se formait, au cours de l'expérience, des composés intermédiaires entre la dioxycétone et la matière solide de la zooglée d'une part, KCN d'autre part, composés instables s'oxydant rapidement d'une manière irréversible. Les expériences de SMYTHE sur le méthylglyoxal et KCN nous ont fait connaître des faits analogues, uniques jusqu'ici.

§ 4. Action sur le potentiel d'oxydo-réduction.

Le cyanure de potassium, même à de fortes concentrations, (N/10) n'inhibe pas le pouvoir-oxydo-réducteur de *B. xylinum*, il ralentit seulement la vitesse d'oxydo-réduction qui passe à environ la moitié de sa valeur.

CHAPITRE VIII

CONCLUSION

Deux faits nouveaux ont été mis en évidence sur *Bacterium xylinum*.

1° — Cette bactérie peut croître en anaérobiose, et former sa zooglée cellulosique, à condition que le milieu contienne un des alcools ou polyalcools qu'elle peut oxyder en aérobiose, et que le potentiel d'oxydoréduction du milieu soit maintenu, au moyen d'un colorant approprié à une valeur supérieure à $rH^2 = 8$.

2° — KCN augmente les oxydations de cette bactérie, fait à rapprocher de l'oxydation du méthylglyoxal en présence de KCN, découvert par SMYTHE (1932); l'oxydation de la dioxyacétone en solution minérale est également augmentée par la présence de KCN. Une zooglée bactérienne longuement lavée, dépourvue absolument de dioxyacétone, consomme plus d'oxygène (400 à 600 p. cent d'augmentation) que les témoins; la zooglée tuée par ébullition ne présente plus ce phénomène. Il s'agit donc ici d'une catalyse d'oxydation d'un type encore absolument inconnu dans les cellules vivantes.

Les conditions de la respiration, de la croissance, des oxydoréductions de *B. xylinum*, ont été étudiées en détail, en fonction du milieu, du substrat organique. De nouveaux corps ont été étudiés: monoacétine du glycérol, β glucoheptitol sont des aliments pour la bactérie (respiration, croissance, oxydoréduction), di et triacétine du glycérol méthyl et éthylglycol et leurs acétates sont inutilisables par la bactérie. De même, des inhibiteurs de la croissance ont été étudiés: divers bromacétates, et isosulfocyanates.

BIBLIOGRAPHIE

AUBEL ET GENEVOIS. — Phénomènes d'oxydo-réduction produits par la levure en anaérobie. *P.-V. Soc. sc. Phys. Bx.* **93**, 25 mars 1926 ;

— Recherches sur la réduction de la thionine par diverses substances organiques, à l'abri de l'air et de la lumière. *C. R.* **184**, 94, 1926.

— Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la levure de *Bacterium coli* et des milieux où croissent ces microorganismes. *C. R.* **184**, 1676, 1927.

— Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs (Traduction de O. WARBURG « Stoffwechsel der Tumoren » 2 vol., Alcan 1928.

— Etat actuel de la question des ferments. *Mémorial des sciences physiques*, Gauthier-Villars, 1928.

— Sur la valeur du potentiel d'oxydo-réduction des cellules de levure. *Annales de la Brasserie*, **27**, 87, 1928.

— Les oxydoréductions. *Revue générale de botanique*, **40**, 1928.

AUBEL, GENEVOIS et WURMSER. — Sur le potentiel apparent des solutions de sucres réducteurs. *C. R.* **184**, 407, 1927.

AUBEL et WURMSER. — Sur l'utilisation de l'énergie libérée par les oxydations. *C. R.* **179**, 848, 1924.

— Sur le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de mammifères. *C. R. Soc. Biol.* **101**, 880, 1929.

AUSTIN. — Relations between rotary power and structure in the sugar group. XXVIII. The conversion of d α glucoheptose to a new ketose d α glucoheptulose. *Journ. Of Am. Chem. soc.* **52** [3], 2106, 1930.

BARRENSCHEN (H. K.) et BRAUN (Karl). — Untersuchungen, über die Glykolyse des Blutes. *Biochem. Z.* **231**, 144-172, 1930.

BARRENSCHEN (H. K.), BRAUN (Karl) et MICKLOS DIEGUN. — Glykolyse, Remmung und Méthylglyoxalanhäufang. *Biochem. Z.* **252**, 165-180, 1930.

BERNHAEUER (K.). — Die oxydativen Gärungen. Berlin, Springer 1932.

BERNHAEUER (K.) et SCHÖN. — *Hoppe-Zeyler* **177**, 107, 1928 ; **180**, 232, 1929.

BERTHELOT. — Transformation de la mannite et de la glycérine en un sucre proprement dit. *Ann. chimie et Phys.* **50** (3^e série) 369, 1857.

BERTHO (Alfred). — Die Essiggärung (Ergebnisse der Enzymforschung) Band 1. Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig 1932.

— Zur Kenntnis des Essigferments *Lieb. Ann.* **474**, 1, 1919.

BERTHO (A.) et BASU (K. P.). — Die Bedeutung der Aldehyd Dismutation für die Essiggärung *Ibid.* **485**, 26, 1931.

BERTRAND (G.). — Préparation biochimique du sorbose. *C. R.* **122**. 900.1896. *Bulletin société chimique*, **15**.627.1896.

— Action de la bactérie du sorbose sur les alcools plurivalents. *C. R.* **126**. 762.1898.

— Sur le produit d'oxydation de la glycérine par la bactérie du sorbose. *C. R.* **126**.842.1898.

— Préparation biochimique de la dioxyacétone cristallisée. *C. R.* **126**.984.1898.

— Action de la bactérie du sorbose sur le sucre de bois. *C. R.* **127**.124.1898.

— Action de la bactérie du sorbose sur les sucres aldéhydiques. *C. R.* **127**.728.1898. *P. V. Bull. Soc. chimique* [3] **19**. 947. 1898.

— Sur l'oxydation de l'érythrite par la bactérie du sorbose ; production d'un nouveau sucre : l'érythrulose. *C. R.* **130**.1330.1900.

— Sur l'hydrogénation de l'érythrulose et la préparation d'une nouvelle érythrite, l'érythrite droite. *C. R.* **130**, 1472.1900.

— Sur une ancienne expérience de M. BERTHELOT relative à la transformation de la glycérine en sucre par le tissu testiculaire: *Bull. Soc. Chimique* [3] **27**.79.1902.

— Sur un nouveau sucre des baies de sorbier. *C. R.* **139**. 802. 1904.

— Sur la synthèse et la nature chimique de la sorbiérite. *C. R.* **139**.983.1904.

— La bactérie du sorbose. Thèse de Doctorat-ès-sciences physiques. Paris Gauthier-Villars. 1904. *Ann. de chimie et physique* [8] **3**, 181.1904.

— Un nouveau sucre cristallisé, le perséulose à 7 atomes de carbone. *C. R.* **147**.201.1908.

— Sur la constitution du perséulose. *C. R.* **149**.225.1909.

BERTRAND (G.) et NITZBERG (G.). — Préparation par la Bactérie du sorbose d'un nouveau sucre réducteur à 7 atomes de carbone. *C. R.* **186**.925.1928. *Bull. Soc. chimique*. **43**.663.1928.

— La fonction cétonique de l' α glucoheptulose. *C. R.* **186**.1172. 1928.

— Sur l' α glucoheptulite. *C. R.* **186**.1173.1928.

— Sur l' α glucoheptulose et l' α glucoheptulite. *Bull. Soc. chimique*, **43**.1019.1928.

BERTRAND (G.) et MME ROSENBLATT. — Action de la chloropierine sur quelques fermentations bactériennes. *C. R.* **170**. 1468.1920.

BERTRAND (G.) et SAZERAC (R.). — Sur une différenciation biochimique de deux principaux ferments du vinaigre. *C. R.* **132**.1504.1901.

— Activation de la fermentation acétique par les sels de Manganèse. *C. R.* **157**.149.1913.

BIERNACKI. — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alcoholgärung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur der Ferment menge und die Vereinigung mit einander. *Pfluger's Archiv*. **49**. 112., 1891 (*Archiv. für. physiologie*).

BOUTROUX. — Sur la fermentation acide du glucose. *C. R.* **102**. 924.1886.

— Sur l'oxydation du glucose par les microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, p. 309, 1888.

— Sur les produits d'oxydation de l'acide oxygluconique. *C. R.* **127**, 1224, 1898.

BRISOU (J.). — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique des tissus animaux normaux et cancéreux, *in vitro* et *in vivo*. *C. R. Soc. Biol.* **112**, 1391, 1933.

BROWN (A.J.). — On an acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem. Soc.* **49**, 432, 1886.

BROWNE (C. A.). — *J. Am. Chem. Soc.* **28**, 463-468, 1906.

CANNAN, COHEN (B.) et CLARK (W. MANSFIELD). — Studies on oxidation-reduction. X. Reduction potential in cell suspensions. U. S. Pub. Health Reps., Supp. N°55, 1926.

CAYROL (P.) Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation alcoolique *C. R.* **193**, 446, 1931.

CAYROL (P.) et GENEVOIS (L.). — Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levures, sans arrêt ni de la respiration, ni de la réaction de Pasteur-Meyerhof, ni de la croissance. *C. R.* **192**, 1494, 1931.

— Sur l'inhibition de la fermentation alcoolique par divers dérivés bromés ou non. *Procès-verbaux Soc. Sc. Phys. Bx.* 7 décembre 1931.

CHAPHEAU (Marc) Sur la respiration des hématies du Siponcle. *Bull. Soc. Biol. Arcachon.* **25**, 157, 1928.

— Action des colorants vitaux sur la respiration des hématies du Siponcle. *Bull. Soc. Biol.* **27**, 29-35 et 210-220, 1930.

— Recherches sur le métabolisme cellulaire de quelques Invertébrés marins. *Thèse*, Bordeaux, Cadoret, 1932.

CLARK (W. M.) et ses collaborateurs. — Studies on oxydation-reduction. *Public Health Reports* 1923, 1925, 1926.

CLARK (W. M.). — The determination of Hydrogen Ions. Baltimore. Williams and Wilkins, 3rd ed. 1928.

COHEN (R.) CHAMBERS (R.) et REZNIKOFF (P.). — Intracellular oxydation reduction studies. I. Reduction potential of *Amoeba Dubia* by micro-injection of indicators. *Journ. of. Gen. Physiol.* **11**, 585, 1928.

CORBIÈRE (J.). — Purification du mercure *Bulletin Soc. chim.* **47**, 331, 1930.

COZIC (Marguerite). — Epimérisation de la lactone α glucoheptonique en lactone β glucoheptonique. Diplôme d'études supérieures Paris. Vinck, 1932.

— Inhibition de la croissance et de la respiration de *B. xylinum* par divers dérivés halogénés. *C. R. Soc. Biol.* **112**, 1387, 1933. *Ann. de Brasserie et distillerie*, **31**, 131, 1933.

— Oxydations et réductions déterminées par *Acetobacter xylinum* *C. R.* **196**, 1740, 1933.

DUCLAUX (Emile). — *Traité de microbiologie*. Paris, Masson 1901.

EMERSON. — The effect of certain respiratory inhibitors on the respiration of *Chlorella*. *Journ. gen. physiol.* **10**, 469-77, 1927.

EMMERLING. — Zur Kenntnis des Sorbose-Bacteriums. *B.* (1) **32**, 541, 1899.

(1) *B.* signifie *I. er. des chemisc. Gesellschaft.*

FERNBACH (Auguste). — Sur la dégradation biologique des hydrates de carbone. *C. R.* **151**. 1004. 1910.

FISCHER (Emile). — Reduction von Säuren der Zuckergruppe. *B.* **22**. 2204. 1889.

— Synthese der Mannose und Lävulose. *B.* **23**. 370. 1890. [1]

— Synthese der Traubenzuckers. *B.* **23**. 799. 1890. [2]

— Reduction der Säuren der Zuckergruppe. II. *B.* **23**. 930. 1890. [3]

— Synthesen in der Zuckergruppe. *B.* **23**. 2114. 1890. [4]

— Ueber die optischen Isomeren des Traubenzuckers, des Gluconsäure und der Zuckersäure. *B.* **23**. 2611. 1890. [5]

— Ueber Kohlenstoffreichere Zuckerarten aus Galactose. *A.* (1). **270**. 64. 1892.

— Ueber zwei neue Hexite und die Verbindungen der mehrwertigen Alkohole mit Bittermandelöl. *B.* **27**. 1524. 1894.

— Ueber Kolenstoffreichere Zuckerarten aus Galactose. *A.* **288**. 139. 1895. [1].

— Ueber die Verbindungen der Zucker mit Alkoholen und Ketonen. *B.* **28**. 1145. 1895. [2]

FISCHER (E.) et FAY. — Über Idonsäure, Idose, Idit und Idozuckersäure. *B.* **28**. 1975. 1895.

FISCHER (E.) et PASSMORE. — Ueber Kohlenstoffreichere Zuckerarten aus d-Mannose. *B.* **23**. 2226. 1890.

FISCHER (E.) et PILOTY. — Ueber Kohlenstoffreichere Zuckerarten aus Rhamnose. *B.* **23**. 3102. 1890.

FISCHER (E.) et STAHEL. — Zur Kenntnis der Xylose. *B.* **24**. 528. 1891.

FOERSTER (F.). — Elektrochemie wässriger Lösungen 2^e éd. Leipzig, Barth, 1915.

FREMY et URBAIN. — Etudes chimiques sur le squelette des végétaux. *C. R.* **93**. 126. 1881.

FROMAGEOT (Cl.). — Contribution à l'étude physicochimique du métabolisme. *Journ. chimie physique*. **24**. 513. 623. 1927..

GENEVOIS (L.). — Über Atmung und Gärung in grünen Pflanzen. *Bioch. Z.* **186**. 461-473. 1927. *id.* **191**. 147-157. 1927.

— Coloration vitale et respiration. *Protoplasma*. **4**. 67. 1928.

— Sur la fermentation et la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Revue générale de botanique*. **40**. 13. 1928.

— Les variations de l'intensité respiratoire et de l'intensité de fermentation dans les tissus du pois. *C. R.* **188**. 1338. 1929.

— Métabolisme et fonction des cellules. Masson et C^{ie} 1931.

GENEVOIS (L.) et CAYROL (P.). — Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levures sans arrêt ni de la respiration, ni de la réaction de Pasteur-Meyerhof, ni de la croissance. *C. R.* **192**. 1494. 1931.

— Sur l'inhibition de la fermentation alcoolique par divers dérivés, bromés ou non. *Procès verbaux Soc. Sc. Phys. Bx.* 7 décembre 1931.

GENEVOIS (L.) CAYROL (P.) et NICOLAIEFF (T.). — Action de

(1) A signifie *Liebig. Ann.*

divers dérivés halogénés sur la cellule des champignons inférieurs (levures et moisissures). *C. R. Soc. Biol.* **112**.1382.1933.

GENEVOIS (L.) et KIRRMANN (A.). — Action des aldéhydes et des cétones halogénées sur les cellules de levures. *C. R. Soc. Biol.* **112**.1383. 1933.

GENEVOIS (L.) et NICOLAIEFF (T.). — Sur l'inhibition de la fermentation lactique bactérienne par les acides aliphatiques halogénés en α . *C. R.* **194**.1270.1932.

— Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique bactérienne. *C. R. Soc. Biol.* **112**. 1385.1933.

GILLESPIE. — Reduction potentials of bacterial cultures and of water-logged soils. *Soil S.* **9**.199.1920.

GLASER et ZUCKERMANN. — Ueber Heptoside. *Zeit. f. phys.* **166**.103.1927.

— Ueber Hydrazinverbindungen der α glucoheptose. *Zeit. f. phys.* **167**. 37. 1927.

HAEHN (Hugo). — *Deut. essig. ind.* **33**.385.1929.

HAEN (Hugo) et ENGEL (Margot). — Ueber die Bildung von Milchsäure durch *Bacterium xylinum*. *Zent. für Paras. und infections Krankheiten*. **79**.182.1929.

HAWORTH (W. N.). — La détermination de la structure des hydrates de carbone. *Bull. Soc. chimique* [4]. **45**.1.1929.

— The constitution of sugars. Arnold and Co London 1929.

— Ring structure in the mono di and polysaccharides. Conférence de l'union internationale de chimie. 1930.

HENNEBERG. — Beitrage zur kenntnis der Essigbakterien *Centralblatt für Bak.* 2^{ve} abth. **3**. 223. 1897.

— Weitere Untersuchungen über Essigbakterien. *id.* **4**. 145. 1898.

— Handbuch der Gärungsbakteriologie. Berlin. Paul Parey 1926.

HERMANN (Siegwart). — Über die sogenannte « Kombucha » I *Bioch. Z.* **192**.176.1928.

— Id. II. *Biochem. Z.* **192**.188.1928.

— Über die sogenannte Kombucha. *Bioch. Z.* **214**.357.1929.

HERMANN (Siegwart) et NEUSCHUL (Paul). — Zur Biochemie der Essigbakterien zugleich ein Vorschlag für eine neue Systematik. *Bioch. Z.* **233**.129-216.1931.

HOSOYA (S.) et KUROYA (M.). — Water-soluble vitamin and bacterial growth. *Sc. Reps. Govt. Ins. Inf. Dis. Tokyo.* **2**. 233. 1923.

HOUBEN et WOLLENWEBER. — Hexylresorcien und Phenyläthylresorcien gegen Pflanzenpathogen Pilze. *Bioch. Z.* **204**.448.1926.

HUDSON. — A relation between the chemical constitution and the optical rotary power of the sugar lactones. *Journ. Am. chem. Soc.* **32**. 338. 1910.

— Correlation of optical rotary power and structure in the sugar group. Conférence de l'union internationale de chimie 1930.

IWATSURU (Ryuzo). — Ueber die Vergärung der α ketoglutarsäure durch das *Bacterium xylinum*. *Biochem. Z.* **168**. 34. 1926.

KHOUVINE (Y.). — Synthèse de la cellulose par *A. xylinum* à partir de la mannite et de la sorbite. *C. R.* **196**.1144, 1933.

KHOUVINE (Y.), CHAMPETIER (G.) et SUTRA (R.). — Etude aux rayons X de la cellulose d'*Acetobacter xylinum*. *C.R.* **194**.208. 1932.

KERMACK (W. O.), LAMBIE (C. G.) et SLATER (R. H.). — LXIII Studies in carbohydrate metabolism. I. The utilisation of dihydroxyacetone by the animal body and a method for its estimation. *Biol. Journ.* **20**.186.1926..

KILIANI. — Ueber das Cyanhydrin der Lävulose.

Berichte d. chem. Gesell. **18**.3066.1885.

— *Ibid.* **19**.221.1886.

— Ueber die Einwirkung von Blausäure auf Galaktose.

Ibid. **21**.915.1888.

KLING (A.). — Oxydations biochimiques du propylglycol. *C. R.* **128**. 244. 1899. *Ibid.* **129**. 1252. 1899.

— Oxydation du propylglycol par le *Mycoderma aceti*. *C. R.* **133**. 231. 1901.

— Sur le méthyl-acétylcarbinol. *Ibid.* **140**. 1456. 1905.

— Contribution à l'étude des alcools cétoniques. *Ann. de Chimie et de Physique*, 8^e série, **5**.471.1905.

KLUYVER (A. S.). — The chemical activities of microorganisms. University of London press, 1931.

KLUYVER et LEEW. — *Acetobacter suboxydans* een Meerkwadige azynzumbacterie (une bactérie remarquable). *Tysdchr. Geneesk.* **10**.170.1924. *Bul. I. Pasteur.* **22**.736.1924.

KOLB (L.). — Ueber die Einwirkung verdünnter Lösung von Bariumhydroxyd und anderer Hydroxyde auf Maltose. *Bioch. Z.* **63**.1.1914.

LEVENE et JACOBS. — Über die Hexosen aus der d-Ribose. *Berichte d. chem. Gesell.* **43**.3141.1910.

LIPSCHITZ (W.) et HERTWIG (G.). — Erhaltung der Funktionen aerober Zellen bei Ersatz des freien Sauerstoffs durch chemisch gebundenen « Pseudo anoxybiose » Versuche an Spermatozen. *Pflügers Archiv.* **191**. 51. 1921.

LOBRY DE BRUYN (C. A.) Action des alcalis dilués sur les hydrates de carbone. I. *Rec. Trav. chim. des Pays-Bas.* **14**.156.1895.

LOBRY DE BRUYN (C. A.) et VAN EKENSTEIN (Alberda). — Action des alcalis sur les sucres, II. Transformation réciproque des uns dans les autres des sucres, glucose, fructose, mannose. *Ibid.* **14**.203 1895.

— Action des alcalis sur les sucres III. Transformation des sucres sous l'influence de l'hydroxyde de plomb. *Ibid.* **15**.92.1896.

— Action des alcalis sur les sucres IV. Remarques générales. V. Transformation de la galactose. Les tagatoses et galctoses. VI. La glutose et pseudo-fructose. *Ibid.* **16**.257.262.274. 1897.

LUND. — Quantitative studies on intracellular respiration. I. Relations of oxygen concentration and the rate of intracellular oxydation in *Paramecium caudatum*. *Ann. J. Physiol.* **45**. 351-365. 1918.

MAQUENNE. — Sur l'acide galactosecarbonique. *C. R.* **106**.286. 1888.

MARCOFF (W.) et ZLATAROFF. — Morphologie et biochimie du

« champignon japonais ». *Annuaire de l'Univers. de Sofia. Faculté physico-mathématique.* **21** et **22**, Livre II (Chimie) 1926.

MAYER-REICH (N.). — Action de l'oxygène sur les glucides évolués à l'abri de l'air. *C. R.* **196**, 1337. 1933.

MEUNIER (J.). — Sur les composés que la mannite et la sorbite forment avec les aldéhydes. *Ann. Chimie et physique* [6] **22**, 412. 1891.

MEYERHOF (O.). — Chimie de la contraction musculaire. Traduction française par L. GENEVOIS. Delmas, Bordeaux, 1932.

MICHAELIS (J.). — Oxydations-Réductions-Potentielle. Springer, Berlin, 1929.

MOLINARI (E.). — Über die biochemische Dismutation nebst. Untersuchungen über die Essiggärung. *Biochem. Z.* **216**, 187. 1929.

NEF (J. U.). — Dissociationsvorgänge in der Zuckergruppe. I. Ueber das Verhalten der Zuckerarten gegen die Fehling'sche Lösung sowie gegen andere Oxydationsmittel. *Ann. L.* **357**, 214. 1907.

— II. Ueber das Verhalten der Zuckerarten gegen Altralkalien. *Ibid.* **376**, 1. 1910.

NEUBERG (C.) et NORD (Ef.). — Anwendungen der Abfangmethode auf die Bakterien-gärungen II. Festlegung der Aldehydstufe bei der Essiggärung. *Biochem. Z.* **96**, 158. 1919.

NEUBERG (C.) et MOLINARI (E.). — Über den Verlauf der Essiggärung. *Naturw.* **14**, 758. 1928.

NEUBERG (C.) et RINGER. — I. Die Bernsteinsäuregärung der α ketoglutarinsäure. *Biochem. Z.* **71**, 226. 1915.

— II. Die Entstehung von Bernsteinsäure bei der Fäulnis von α ketoglutarinsäure. *Ibid.* **71**, 237. 1915.

NEUBERG (C.) et SIMON (E.). — Beiträge zur Biochemie des Asymmetrie Problem (Asymmetrische Dismutation). *Biochem. Z.* **179**, 443. 1926.

NEUBERG (C.) et WINDISCH. — Ueber die Essiggärung und die chemischen Leistungen der Essigbakterien. *Ibid.* **166**, 454. 1925.

NEUBERG (Irène). — Untersuchungen in der 3-Kohlenstofffreie und Gewinnung von Zuckern aus ihren Hydraten. *Ibid.* **255**, 1932.

NITZBERG. — Contribution à l'étude des sucres à 7 atomes de carbone. Thèse Paris, 1928.

OSTERWALDEN. — Milchsäurebildung durch Essigbakterien. *Zentralblatt f. Bak. und Parasitenkunde. Abt. II.* **37**, 353. 1913.

PALLADINE (W.), HUBBENET (E.) et KORSKOW (M.). — Ueber die Wirkung von Methylenblau auf die Atmung und die alkoholische Gärung lebender und abgetöter Pflanzen. *Bioch. Z.* **35**, 1. 1911.

PEIRCE. — The configuration of some of the higher monosaccharides. *J. Biol. chem.* **23**, 327. 1915.

PELOUZE. — Sur une nouvelle matière sucrée extraite des baies de sorbier. *A. ch.* [3] **35**, 22. 1852. *C. R.* **34**, 377. 1852.

PHILIPPE. — Recherches sur les matières sucrées supérieures dérivées du glucose. *Ann. chimie et physique* [8] **26**, 289-418. 1912.

— Thèse de doctorat ès-sciences physiques. Gauthier-Villars, Paris, 1912.

QUASTEL (Juda Hirsch). — L'étude des bactéries non proliférantes. *Bull. Soc. Biol.* **10**, 1282. 1928.

— Quelques travaux récents sur les actions chimiques des bactéries, leur relation avec les problèmes de fermentation. *Ann. de brasserie et distillerie*. **10.12.1928**.

— Reduction potential energy exchange and cell growth. Experiments with *B. coli*. *Bioch. Journ.* **23**.115-137.1929.

— Bacterial métabolism. (Ergebnisse der Enzymforschung 1 Band) Akademische verlagsgesellschaft. Leipzig 1932.

QUASTEL (J.-H.) et WOOLDRIDGE (W. R.). — The effects of chemical and physical changes in environment of resting bacteria *Biochem. J.* **21**.148.1927.

— Experiments on bacteria in relation to the mechanism of enzyme action. *Bioch. J.* **21**.1224.1927.

QUÉRÉ (H.). — L'oxydation des alcools par les ferments acétiques, considérée comme une forme de la respiration cellulaire. *C. R.* **192**. 1494.1931.

— Inhibition de la croissance et du métabolisme chez les ferments acétiques. *C. R. Soc. biol.* **110**.958.1932.

— Inhibition de la fermentation acétique par divers dérivés halogénés. *C. R. Soc. biol.* **112**.1388.1933.

RADOËFF (A.). — Stimulation de la croissance par des sels minéraux, des colorants vitaux et divers composés organiques chez le Riz (*oriza sativa*). *C. R. Soc. biol.* **110**.955.1932.

— Recherches sur la stimulation de la croissance et le métabolisme dans les tissus du blé. *C. R.* **194**.1527.1932.

— Inhibition de la fermentation alcoolique des végétaux supérieurs par l'acide monobromacétique et ses esters. *C. R. Soc. Biol.* **112**.1393.1933.

REID (A.). — Manometrische Messung der Sauerstofflosen Atmung (Versuche mit Essig-Bakterien) *Biochem. Z.* **242**.159-169.1931.

SAZERAC (R.). — Sur une bactérie oxydante, son action sur l'alcool et sur la glycérine. *C. R.* **137**. 90. 1903.

SCHMIDT (E.) ATTERER (M.) et SCHEGG (H.). — *Cellulose Chemie*, **12**.235-241.1931.

SCHULTZ (H.). — Ueber Hefegifte. *Archiv. für Physiologie*. **42**. 517. 1888.

SCHUTZENBERGER. — Sur la formation d'un acide carbogluco-sique. *Bull. Soc. Chim.* [2] **36**. 144. 1881.

SCHWARTZ et OSCHMANN. — Le taux de l'acide lactique musculaire dans les contractures des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. Biol.* **92**. 169. 1925.

SHIBATA et TAMIYA. — Untersuchungen über die Bedeutung des Cytochroms in der Physiologie der Zeelatmung. *Acta Phytochimica*. **5**.23.1930.

SHOUP (Charles) et BOYKIN (James T.). — The insensivity of *Paramecium* to cyanide and effects of iron in respiration. *J. Gen. Physiol.* **15**.107-118.1932.

SIMON (E.). — Über das zymatische System und die Wirkung der Essigbakterien. *Bioch. Z.* **224**.253.1930.

SMYTHE (C. V.). — Bildung von Brenztraubensäure aus Methyl-

glyoxal durch Katalytische Wirkung der Blausäure. *Ber. der. Chem. Gesell.* **65**.819.1932.

— Oxydation von Methylglyoxal durch molekularen Sauerstoff bei Gegenwart von Blausäure. *Ibid.* p.1268.

— Über die Wirkung von Blausäure auf Methylglyoxal. *Biochem. Z.* **257**.371.1933.

STEPHENSON (Marjorie). — Bacterial metabolism. Longsmann, London 1930.

SUTRA (R.). — Etude des celluloses d'*Acetobacter xylinum* et de Tuniciers. *C. R.* **181**.195.1932.

TAKAHASHI (Teizo) et ASAI (Toshinobu). — *Bacterium industrium Acetobacter*. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **7**.1-5.1931.

— *Zent. Bakt. Parasitenk.* **84**.193-195.1931.

TAMIYA (H.) et TANAKA (K.). — Zur Physiologie der Essigsäuregärung; I. Ein Beitrag zur Kenntnis der Bedeutung des Cytochroms in der Physiologie der Zellatmung. *Acta Phytochimica.* **5**. 167. 1931.

TANAKA (K.). — Zur Physiologie der Essigsäuregärung. II. Über die Einwirkung des Kaliumcyanids und des Acetols und über die Dismutation. *Acta Phytochimica.* **5**.239-266.1931.

TARR (H.) et HIBBERT (H.). — Studies on reactions relative to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharide synthesis by the action of *Acetobacter xylinum* on carbohydrates and related compounds. *Chem. Abs.* **25**.3969. *Can. J. Research.* **4**.372-388.1930.

TOLLENS. — Ueber Methylen Glucose aus Glucose, Formaldehyd Salzsäure ein neues Glucosid. *Berichte der chem. Gesell.* **32**.2585.1899.

VINCENT (C.) et DELACHANAL. — Préparation biologique du lévulose au moyen de la mannite. *C. R.* **125**.716.1897.

VIRTANEN (A.) et BÄRLUND (B.). — Die oxydation des Glycerins zu Dioxyceton durch Bakterien. *Biochem. Z.* **169**. p. 169. 1926.

VISSER'T HOOFT. — Etude biochimique de *Acetobacter*. *Deut. essig. ind.* **30**. 92. 1926.

— Biochemische Onderzoekingen over het geslacht *Acetobacter* Boekhandel et Drukkerij. W. D. Weinema edit. Delft.

VOTOCEK (E.). — L'histoire des méthylpentoses et l'état actuel de leur chimie. Conférence *Bull. Soc. chim.* **43**. (4^e série), 1, 1928.

VOTOCEK (E.) et KUCERENKO (V.). — Etudes dans la série du fucose (1 galaméthyle) et de l'épifucose. *Coll. Trav. chim. de Tchecos.* **2**. 47. 1930.

VOTOCEK (E.) et VALENTIN (F.). — Etudes dans la série du rhodéose (d-galactométhyle) et de l'épirhodéose. *Coll. des Trav. chim. de Tchecos.* **2**. 36. 1930.

VOTOCEK (E.), VALENTIN (F.) et RAC (F.). — *Ibid.* **2**. 402. 1930.

WARBURG (Otto). — Ueber die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* **100**.230.1919.

— Ueber die Wirkung des Kohlenoxyds auf des Stoffwechsel der Hefe. *Ibid.* **77**. 471. 1926.

— Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer, 1926.

— Métabolisme cellulaire et métabolisme de tumeurs. (Traduction

française de « Stoffwechsel der Tumoren » par E. AUBEL et L. GENEVOIS, Paris, Alcan, 1928.

WARBURG (Otto) et CHRISTIAN (Walter). — Uber ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum *Biochem Z.* **254**. 438-458, 1932.

WATANABE. — Physiology of the metabolism of algae. I. Influence of KCN and methylene blue on the respiration of green algae. *Acta Phytochimica* **6**.315.1932.

WHERRY (E. T.). — Optical properties of a serie of heptitols. *J. of biol. chem.* **42**.377.1920.

WIELAND (H.). — Uber Hydrierung und Dehydrierung. *Ber., der chem. Gesell.* **45**, 484, 1912, [1].

— Studien über den Mecanismus der Oxydationsvorgänge. *Ibid.* **45**.2606.1912. [2].

— Uber den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. *Ibid.* **46**.3327.1913.

WIELAND et BERTHO. — Uber den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. *Liebig's Annalen der Chemie*, **476**.95.1928.

WILDIERS. — Nouvelle substance indispensable au Développement de la levure. *La Cellule*, **18**. 314. 1901.

WILLSTÄTER, (R.), SEITZ (F.) et BUMM (E.) — Sur la méthode d'hydrogénation par l'amalgame de sodium. *Ber. der. Chem. Gesell.* **61**.871.1928.

WOHL (A.) et FREUDENBERG (K.). — Die Bezeichnung sterischen Reihen. *Ber. der Chem. Gesell.*, **56**.309.1923 et **58**.451.1925.

WOLFROM et LEVIS. — I. — The reactivity of methylated sugars. II. — The action of dilute alkali on tetramethyl glucose. *J. of. Am. chem. Soc.* **50**.237.1928.

WURMSER (R.). — Oxydations et réductions. Paris, Presses universitaires. 1930.

— Signification des potentiels d'oxydo-réduction pour les réactions enzymatiques. (Ergebnisse der Enzymforschung) 1^{er} Band Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1932.

WURMSER (R.), MAYER-REICH (N.). — L'équilibre entre les acides lactique et pyruvique. *J. Chim. Physique*. **30**.249-65.1933.

ERRATUM

Lire VOTOČEK[✓] au lieu de VOTOCEK.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. —	7
CHAPITRE PREMIER	
<i>Bacterium xylinum</i>	9
CHAPITRE II	
Les aliments carbonés de <i>Bacterium xylinum</i>	26
CHAPITRE III	
Préparation de divers sucres et polyalcools.	38
CHAPITRE IV	
Métabolisme de <i>Bacterium xylinum</i>	64
CHAPITRE V	
Colorants et croissance anaérobie.....	83
CHAPITRE VI	
Action de quelques inhibiteurs sur la croissance, la respiration et le pouvoir oxydoréducteur de <i>Bacterium xylinum</i>	97
CHAPITRE VII	
Action du cyanure de potassium sur <i>Bacterium xylinum</i>	103
CHAPITRE VIII	
CONCLUSION.....	115
BIBLIOGRAPHIE.....	117

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Désintégration artificielle du noyau.

Vu :
Le Président
G. DUPONT

Vu :
Le Doyen
G. DUPONT

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 1^{er} juillet 1933
Le Recteur,
A. TERRACHER

